



HAL
open science

Etude du système nerveux entérique au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les troubles du spectre de l'autisme

Morgane E. Le Dréan

► To cite this version:

Morgane E. Le Dréan. Etude du système nerveux entérique au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les troubles du spectre de l'autisme. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU1039 . tel-04612712

HAL Id: tel-04612712

<https://theses.hal.science/tel-04612712v1>

Submitted on 14 Jun 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.

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Neurosciences, Neurogastroentérologie

Par

Morgane Eileen LE DRÉAN

Etude du système nerveux entérique au sein de l'axe
microbiote-intestin-cerveau dans les troubles du
spectre de l'autisme

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12 décembre 2023

Unité de recherche : INSERM U1235 - TENS

Rapporteurs avant soutenance :

Christelle GOLZIO HDR - IGBMC Translational Medicine and Neurogenetics Department (Strasbourg)
Nicolas CENAC DR – IRSD INSERM U1220 - POGBA (Toulouse)

Composition du Jury :

Président : Hervé BLOTTIERE DR – PHAN INSERM U1280 (Nantes)
Examineurs : Hervé BLOTTIERE DR – PHAN INSERM U1280 (Nantes)
Dir. de thèse : Hélène BOUDIN HDR – TENS INSERM U1235 (Nantes)

Invité(s)

Michel NEUNLIST DR – TENS INSERM U1235 (Nantes)
Co-enc. de thèse : Sophie TALON MC – TENS INSERM U1235 (Nantes)

« Dis-lui que la crainte de la souffrance est pire que la souffrance elle-même. Et qu'aucun cœur n'a jamais souffert alors qu'il était à la poursuite de ses rêves »

Paulo Coelho dans L'alchimiste

« Passe ta thèse déjà, tu verras bien après »

Papa dans ... la cuisine

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrantes de thèse, Hélène Boudin et Sophie Talon. Hélène, je tiens à t'exprimer ma plus profonde gratitude. J'ai tellement appris et grandi à tes côtés. Merci pour ta bienveillance, ton profond investissement dans l'encadrement de cette thèse, ton humanité, ton dynamisme, ta gaieté et ton incroyable passion. Tu es pour moi une véritable mentore, de par ton expertise scientifique, ta rigueur et tes grandes qualités humaines. J'ai profondément aimé travailler avec toi mais aussi avoir ces grandes discussions sur tout et rien, et rigoler de nos blagues au détour d'un couloir. **Merci pour tout.** Un immense merci aussi à Sophie, pour ton incroyable énergie et ton investissement dans la supervision de ma thèse. Merci pour tes idées, ton humour mais aussi pour m'avoir poussée et encouragée dans tous les moments de cette thèse ainsi que dans l'enseignement lors de mes vacances. Vous êtes un duo incroyable et je suis très heureuse de vous avoir eu comme mentores.

Merci également à Michel Neunlist de m'avoir accueillie dans son laboratoire, où la rigueur et l'intégrité scientifique se mêlent à la bonne humeur et à la cohésion d'équipe. Merci Michel pour ton aide, tes conseils, ton incroyable expertise sur le SNE et ton humour aux réunions Autisme (mes réunions préférées).

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse, Christelle Golzio, Nicolas Cenac et Hervé Blottière. C'est un honneur de vous avoir pour l'évaluation de ce travail de thèse. Christelle et Nicolas, merci infiniment d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit et j'espère que la lecture de ces pages vous procurera autant de plaisir et d'intérêt que j'en ai eu à les rédiger.

Un grand merci aux membres de mon CSI, Gwenola Le Dréan et Pascal Dournaud, pour tous vos conseils, retours et soutien qui ont su enrichir ce travail de thèse.

Je remercie par ailleurs tous les chercheurs et ITA du laboratoire pour leurs conseils, soutien, bonne humeur et humour qui m'ont fait passer un si bon moment à TENS. Je remercie ici particulièrement Martial Caillaud (de sang), Justine Marchix, Catherine Le Berre-Scoul, Thibault Oullier Tony Durand et Philippe Aubert pour leur précieuse aide et la transmission de leur expertise au laboratoire. Un grand merci à Lisa Brossard pour ses connaissances, sa rigueur et sa ténacité.

Un grand merci aussi à Katy Fontaine et Karelle Smadja pour leur joie, les rires et leur incroyable expertise de l'administration. Merci pour toute votre aide !

Merci à tous les étudiants et doctorants de TENS. Merci à La Marine, Adrien (notre dieu à tous), Le Rodrigue, Le couz' Killian et Ségo pour le nombre de rires incalculables (et de bières). Merci aussi à Elise, Jacques, Lola, Théo, Baptiste, Catherine et récemment Matheus, la relève des doctorants est assurée. Merci aussi à tous les stagiaires (particulièrement le cru M2 2023, les petites souris du laboratoire, s'infiltrant partout et étant des sources inépuisables de potins). Un grand merci aussi aux stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer, Kevin, Lou-Anne, Léa et Maëva. Vous avez tous été géniaux et ça a été un vrai plaisir de vous accompagner et de vous guider comme j'ai été accompagnée et guidée au cours de mes études.

Vraiment, du plus profond de mon cœur, un immense et chaleureux merci à tous les membres de l'U1235. J'ai passé 3 merveilleuses années, dans une ambiance de travail si agréable.

Remerciements

Je tiens aussi à remercier chaleureusement toute l'équipe de la sécurité du bâtiment. Merci d'avoir veillé à notre sécurité et d'être venu me voir de temps en temps à mon bureau tard le soir pour s'assurer que tout allait bien (et me surprendre à chanter du Lady Gaga !). D'ailleurs, merci à Lady Gaga et Britney Spears, vous avez constitué l'hymne de mes nombreuses longues soirées, seule au laboratoire.

J'ai aussi une petite pensée pour les souris et rats que j'ai utilisés tout au long de ma thèse, merci de ce sacrifice auquel j'essaye de toujours faire honneur et sans lequel la recherche ne pourrait pas avancer aussi vite.

Merci à ma salle de sport Keep Cool d'Hôtel Dieu pour votre investissement et votre bonne humeur. A défaut de 3 à 4 séances de sport d'1h30 par semaine, pendant ces 3 années de thèse, j'ai passé environ 702 h dans votre salle de sport.

Un profond merci à mes colocataires : Vous avez été et êtes ma famille Nantaise, mes amis, mes confidents, mes inspirations : Ma Amandouillette, La mère Montbrun, Le Guigz', La Lou, La Marion, La Cléo, Maëlitose, et plus récemment Selin dont la joie et la bonne humeur est envahissante.

Un grand merci à mes amis, particulièrement Ma Cécile d'amour (Mich'), Ma Nono, Ma Djudju et Ma Saroush. Je vous aime tellement, merci pour votre soutien et encouragements !

Merci à cette petite marmule qui est entrée dans ma vie il y a un an jour pour jour et que j'aime, admire et qui m'inspire à me dépasser tous les jours un peu plus.

Un immense merci à mes sneaky-snakes, mes amis d'enfance, comparses de toujours, Juliette et Alexis, vous-même vous savez l'amour immense que j'ai pour vous. Merci pour votre soutien depuis toutes ces années. Vous êtes le S et je vous aime profondément.

Merci à ma famille, mon grand frère que j'aime de tout mon cœur et que j'admire tellement, mes grand-mères adorées qui ne sont plus là mais auxquelles je pense tous les jours.

Enfin, comment remercier assez mes parents... Merci de m'avoir transmis votre passion de la recherche, (merci maman de m'avoir fait disséquer des poissons à 8 ans pour apprendre l'anatomie). Merci pour **votre amour inconditionnel**, votre soutien et votre incroyable investissement dans nos études. Je suis tellement chanceuse et fière de vous avoir comme parents et vous m'inspirez à chaque minute de ma vie. **Merci**

En écrivant les derniers mots de cette thèse, j'ai une pensée émue pour la jeune fille de 14 ans que j'étais, passionnée déjà, dévorant tous les livres sur les neurosciences que l'Espace des Sciences de Rennes proposait. J'ai découvert les auteurs Temple Grandin, puis plus tard Daniel Tammet, qui m'ont transportée dans le monde fascinant de l'autisme, dont je ne suis jamais sortie...

Table des matières

Liste des publications et communications scientifiques	11
Liste des abréviations	13
Liste des figures et tableaux	14
Introduction générale	15
Chapitre 1: Le Système nerveux entérique	19
I. Introduction générale et contexte anatomique : Le système digestif	19
1. Anatomie du système digestif :	19
2. La barrière épithéliale intestinale :	20
3. L'innervation du système digestif : Le SNE comme acteur principal	22
II. Le système nerveux entérique : Introduction et organisation	24
1. Historique de la découverte du SNE	24
2. L'organisation en plexus du SNE	25
3. Les neurones entériques	26
4. Les cellules gliales entériques (CGE)	30
5. Les marqueurs moléculaires du SNE :	32
III. Rôle du SNE dans les fonctions digestives	32
1. Contrôle de la motricité digestive :	33
2. Contrôle de l'activité sécrétoire :	34
3. Contrôle de la BEI :	35
IV. Le développement et maturation du SNE :	36
1. Migration et colonisation des précurseurs du SNE	36
2. Les voies moléculaires impliquées dans la migration	38
et prolifération des PCNEs	38
3. Différenciation	40
4. Maturation post-natale	41
V. La synapse du SNE	42
1. Maturation du réseau synaptique	42
2. La synapse mature du SNE	43
3. La plasticité synaptique du SNE	44
VI. L'intime relation du SNE avec le SNC	46
1. La part prépondérante du microbiote intestinal	47
2. Connexions SNE-SNC par les voies humorales	47
3. Connexions SNE-SNC par les voies nerveuses	48
4. Implication dans les maladies du cerveau	49
Chapitre 2 : Les troubles du spectre de l'autisme	51
I. Présentation générale :	51
1. Historique :	51

2.	Diagnostic :	52
3.	Outils d'évaluation des TSA :	53
4.	Prévalence des TSA :	55
5.	Le sexe ratio dans les TSA	57
II.	Etiologie des TSA	58
1.	Causes génétiques	58
2.	Les causes environnementales :	61
3.	L'épigénétique :	64
III.	Les modèles animaux des TSA	64
1.	Les modèles génétiques :	64
2.	Les modèles environnementaux :	65
3.	Les modèles d'autisme syndromique et idiopathique :	66
IV.	Les atteintes centrales et les comorbidités psychiatriques associées à l'autisme	66
1.	Les atteintes centrales observées dans les TSA	67
2.	Les comorbidités psychiatriques et neurologiques	67
V.	Les atteintes entériques et digestives associées à l'autisme	68
1.	Les troubles gastrointestinaux associés à l'autisme :	68
2.	Atteintes de la physiologie digestive :	69
3.	Atteintes du SNE :	70
	Chapitre 3: Le Microbiote Intestinal	73
	Partie 1 : Présentation générale du microbiote intestinal	73
I.	Introduction générale	73
1.	Présentation :	73
2.	Historique de la découverte du microbiote intestinal	74
3.	Classification phylogénétique des bactéries du MI	75
II.	Les méthodes d'analyse du MI	76
1.	La culture in vitro	76
2.	Méthodes génomiques	76
3.	Méthodes indirectes	79
4.	Indicateurs de la diversité bactérienne	81
III.	Le MI au cours de la vie de l'hôte	82
1.	Une colonisation à la naissance	82
2.	Le MI au cours de la vie adulte	83
3.	De la résilience du MI à la dysbiose	84
4.	Le MI face au vieillissement	84
5.	Un MI généré ?	85
IV.	Rôle du MI dans les grandes fonctions digestives	87
1.	Rôle dans le métabolisme et la digestion	87

2.	Rôle sur la BEI	87
3.	Rôle dans la motricité digestive.....	88
V.	Impact du MI sur le SNE	88
1.	Sur le développement et le remodelage du SNE	88
2.	Sur la communication neuronale entérique.....	89
VI.	Les médiateurs du MI	89
1.	Les acides gras à chaînes courtes (AGCC)	89
2.	Les acides biliaires secondaires	91
VII.	Impact du MI sur le cerveau	93
1.	Impact sur le comportement.....	93
2.	Impact sur la plasticité du SNC	94
	Partie 2 : Le microbiote intestinal dans l'autisme	95
I.	Un microbiote TSA ?	95
1.	Composition microbienne du MI des individus avec TSA.....	95
2.	MI des modèles animaux des TSA	97
II.	Les métabolites modifiés dans l'autisme	99
1.	Les AGCCs	99
2.	Les acides biliaires secondaires	100
3.	Autres métabolites notables dans l'autisme	101
III.	Approches thérapeutiques dans les TSA visant le MI.....	102
1.	Les approches probiotiques.....	102
2.	La transplantation fécale	104
3.	Autres approches : Supplémentation en AGCCs	106
	Objectifs de thèse.....	109
	Article 1.....	111
	Article 2.....	131
	Article 3.....	161
	Résultats Supplémentaires	185
	Discussion	187
	Conclusion	195
	Annexes	197
	Références	209

Liste des publications et communications scientifiques

Articles scientifiques originaux :

- Caillaud, M., **Le Dréan, M. E.**, De-Guilhem-de-Lataillade, A., Le Berre-Scoul, C., Montnach, J., Nedellec, S., Loussouarn, G., Paillé, V., Neunlist, M., & Boudin, H. (2023). A functional network of highly pure enteric neurons in a dish. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 1062253. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1062253>

Articles en reviewing :

- **Morgane E Le Dréan**, Catherine Le Berre-Scoul, Martial Caillaud, Philippe Hulin, Michel Neunlist, Sophie Talon and Hélène Boudin : The regulation of enteric neuron connectivity by Semaphorin 5A is lost by an autism-linked mutation (reviewing journal **iScience**)

Articles en préparation :

- **Morgane E Le Dréan**, Justine Marchix, Martial Caillaud, Maëva Rebion, Catherine Le Berre-Scoul, Philippe Hulin, Magalie Feyeux, Antonin Lamazière, Marion Leboyer, Sophie Talon, Michel Neunlist, Hélène Boudin : The microbiota-derived metabolite deoxycholic acid is associated with autism spectrum disorder and regulates enteric neuron activity and connectivity
- J. Marchix ; **ME. Le Dréan** ; T. Oullier ; P. Aubert ; J. Z. Brouillet ; J. Doré ; L. Davidovic ; M. Leboyer ; H. Boudin¹; M. Neunlist. Fecal microbiota from adult with autism spectrum disorder alters brain and digestive functions in recipient mice

Revues :

- **Dréan, M. E.** L., Marchix, J., Neunlist, M., & Boudin, H. (2021). Sept minutes pour comprendre le microbiote intestinal et son impact sur la santé. 28. Hépato-Gastro & Oncologie Digestive DOI: [10.1684/hpg.2021.2172](https://doi.org/10.1684/hpg.2021.2172)
- L., Marchix, J. **Dréan, M. E.**, Neunlist, M., & Boudin, H. (2023). L'axe microbiote-intestin-cerveau, un ménage à trois, *Pratiques en nutrition* 19(2) DOI : [10.1016/j.pranut.2023.05.003](https://doi.org/10.1016/j.pranut.2023.05.003)

Abstracts pour conférences :

- J. Marchix; **ME. Le Dréan** ; T. Oullier ; P. Aubert ; J. Z. Brouillet ; J. Doré ; L. Davidovic ; M. Leboyer ; H. Boudin¹ ; M. Neunlist. Fecal microbiota from adult with autism spectrum disorder alters brain and digestive functions in recipient mice. Abstract code: NGS18313-88 | <https://doi.org/10.1111/nmo.14637>
- **M. E. Le Dréan**¹; C. Le Berre-Scoul¹; M. Caillaud¹; P. Hulin²; M. Neunlist¹; S. Talon¹; H. Boudin¹ Role of semaphorin 5A and microbiota on ENS connectivity in autism spectrum disorders Abstract code : NGS18201-84 <https://doi.org/10.1111/nmo.14637>

Communications orales :

- **ESNM (European Society of Neurogastroenterology and Motility) 2023** – Bucarest, Roumanie: Fecal microbiota from adult with autism spectrum disorder alters brain and digestive functions in recipient mice
- **GFNG (Groupe Français de NeuroGastroentérologie) 2023** – Clermont-Ferrand – France : Role of semaphorin 5A and microbiota on ENS connectivity in autism spectrum disorders
- **ENS -development meeting (6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DEVELOPMENT OF THE ENS : THE FIRST 1000 DAYS) 2022**– Ferrara – Italie : Role of semaphorin 5A and microbiota on ENS connectivity in autism spectrum disorders
- **Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Bretagne-Loire (2021)** : Role of semaphorin 5A and microbiota on ENS connectivity in autism spectrum disorders (**Premier prix de la meilleure présentation**)

Poster :

- **ESNM (European Society of Neurogastroentérologie and Motility) 2023** – Bucarest, Roumanie: Role of semaphorin 5A and microbiota on ENS connectivity in autism spectrum disorders

Communications grand public :

- **Semaine du cerveau 2023** : Rôle des métabolites du microbiote intestinal sur la connectivité du système nerveux entérique. Série de conférences en neurosciences, organisées à la Faculté des Sciences et techniques de Nantes dans le cadre de la semaine du cerveau – destinées aux étudiants.
- **Utopiales 2022** : *Le microbiote expliqué aux enfants*. Grand Festival de sciences et de science-fiction ayant lieu à Nantes chaque année. J'ai pu animer une conférence avec Héloïse Chochois, illustratrice scientifique, et faire découvrir aux enfants le monde merveilleux du microbiote.

Liste des abréviations

5-HT: Sérotonine

ACh: Acétylcholine

ADI-R: Autism Diagnostic Interview-Revised

ADOS: Autism Diagnostic Observation Schedule

AGCC : Acides Gras à Chaîne Courte

AH: After-hyperpolarization

ATP: Adénosine triphosphate

BEI : Barrière épithélial intestinal

BTBR: Black and Tan Brachyury- modèle souris d'autisme

CARS: Childhood Autism Rating Scale

CCK : Cholecystokinine

CCNV : Cellules des crêtes neurales vagues

CGE : Cellules gliales entériques

ChAT : Choline acétyltransférase

CHD8: Chromodomain helicase DNA binding protein 8

CIC : Cellules interstitielles de Cajal

CNVs : Copy number variations

DCA : Acide désoxycholique

DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

E: Embryonic day

EFS: Electrical Field Stimulation

GABA: Acide gamma-aminobutyrique

GLP-1: Glucagon-like peptide 1

HDAC : Histones désacétylases

HDCA : Acide hydodéoxycholique

IPANs : Intrinsic Primary Afferent Neurons

LCA : Acide lithocholique

LPS: Lipopolysaccharide

LT: Low-threshold

LTD: Long Term depression

LTP: Long Term Potentiation

MHFD: Maternal High Fat Diet

MI: Microbiote intestinal

MIA : Maternal Immune Activation

NOS : Oxyde nitrique synthase

PCNEs : Progéniteurs de cellules neurales entériques

SHANK3: SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3

SN : Système nerveux

SNAP25: Synaptosome – associated protein of 25 000 daltons

SNC : Système nerveux central

SNE : Système nerveux entérique

SNP : Système nerveux périphérique

SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms

SRS : Social Responsiveness Scale

TGR5 : Takeda G protein-coupled receptors 5

TSA : Troubles du spectre de l'autisme

UDCA : Acide ursodéoxycholique

VIP : Peptide intestinal vasoactif

VPA : Acide valproïque

ZO-1: Zonula occludens-1

Liste des figures et tableaux

FIGURES

Figure 1: Anatomie du système digestif chez l'humain	20
Figure 2: Innervation du tractus gastro-intestinal	23
Figure 3: L'organisation en plexus du SNE chez l'humain	26
Figure 4: Morphologies des neurones entériques selon la classification de Dogiel	27
Figure 5: Enregistrement électrophysiologique d'un neurone « S » et « AH ».....	28
Figure 6: Représentation des différents types morphologiques de glie entérique	31
Figure 7: Schéma du circuit moteur contrôlant le muscle circulaire principal acteur du péristaltisme	34
Figure 8: Migration des progéniteurs dérivés des crêtes neurales dans l'intestin embryonnaire	37
Figure 9: Schéma illustrant la polarisation des neurones fraîchement différenciés.....	40
Figure 10: Observation au microscope électronique des varicosités synaptiques	43
Figure 11: Susceptibilité à l'autisme entre les femmes et les hommes.....	58
Figure 12: Représentation simplifiée des différents facteurs de susceptibilité à l'autisme	60
Figure 13: Modèle souris invalidé pour <i>Shank3b</i>	65
Figure 14: Exemples d'atteintes du SNE chez des modèles animaux des TSA.....	71
Figure 15: Dessin caricatural d'Elie Metchnikoff, <i>le bouffeur de yaourt</i>	75
Figure 16: Vue d'ensemble générale des deux grandes techniques d'analyse génomique du MI	78
Figure 17: Représentation des résultats statistiques d'analyse de la diversité microbienne	81
Figure 18: Les entérotypes.....	83
Figure 19: Modélisation de l'abondance et de la diversité du microbiote intestinal au cours de la vie.....	86
Figure 20: Les métabolisme des sels biliaires primaires et secondaires.....	91

FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Figure S1: Analyse de la motricité intestinale sur des segments de colon distal de rat	185
Figure S2: L'exposition chronique au DCA, augmenté dans l'autisme, modifie l'expression protéique de la Sémaphorine 5A (Sema5A) et de son récepteur Plexin A1 dans les neurones entériques	186

TABLEAUX

Tableau 1: La nature neurochimique des neurones entériques.....	30
Tableau 2: Marqueurs moléculaires principaux du SNE	32
Tableau 3: Diversité des différentes modifications du MI chez les enfants atteints de TSA comparé à des contrôles neurotypiques.....	96
Tableau 4: Modification des différents phyla microbiens du MI chez les modèles animaux des TSA.....	98

Introduction générale

L'autisme, ou trouble du spectre de l'autisme (TSA), regroupe un ensemble de troubles neurodéveloppementaux se caractérisant par des difficultés de communication et d'interaction sociale, ainsi que des comportements répétitifs et stéréotypés. Les TSA affectent un peu plus de 1% de la population mondiale et ce chiffre est en constante augmentation, atteignant jusqu'à 2,7 % aux États-Unis. L'autisme est une pathologie complexe, incluant des causes à la fois génétiques et environnementales, et aucun traitement curatif n'existe à l'heure actuelle. Les seuls traitements et médications proposés visent les comorbidités qui accompagnent très souvent les TSA, avec plus ou moins de succès pour soulager les individus.

Paradoxalement, alors que la société commence à mieux comprendre et accepter l'autisme en tant que condition médicale complexe et diverse, les comorbidités qui l'accompagnent constituent un aspect historiquement négligé et mal compris des TSA.

C'est le cas des troubles gastro-intestinaux dont souffrent entre 4,2% à 96,8% des individus avec TSA. Ces atteintes digestives représentent majoritairement de la constipation chronique, de la diarrhée, des ballonnements et des douleurs abdominales, affectant la qualité de vie des individus et pouvant même empirer leurs troubles comportementaux, dont la sévérité est d'ailleurs corrélée à la sévérité des atteintes gastro-intestinales. Malgré une caractérisation de l'autisme dès le début du 20ème siècle, ce n'est que depuis les années 2010 que les troubles gastro-intestinaux dans l'autisme sont sujets à un réel intérêt scientifique. Cependant, **l'origine et les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux dysfonctions digestives dans les TSA restent encore très mal compris.**

Dans ce contexte, l'étude du système nerveux entérique (SNE), qui contrôle les fonctions digestives et dont l'atteinte conduit à des troubles gastro-intestinaux, prend tout son sens.

Le développement du SNE se fait en parallèle de celui du cerveau, suggérant que des anomalies neurodéveloppementales cérébrales liées à l'autisme pourraient également être présentes dans le SNE. Le développement du SNE au cours de la période embryonnaire et postnatale participent à la mise en place des fonctions digestives chez l'enfant. Cette mise en place du SNE est influencée par des facteurs **génétiques** et **environnementaux** qui, s'ils sont modifiés, pourraient contribuer à la mise en place et au maintien des troubles gastro-intestinaux dans l'autisme. **Néanmoins, le développement et le fonctionnement du SNE dans le contexte de l'autisme restent encore largement inexplorés.**

Parmi les facteurs environnementaux potentiellement impliqués dans ce remodelage développemental et dans les fonctions de l'organe mature, le microbiote intestinal se distingue. En effet, le microbiote intestinal, représentant l'ensemble des micro-organismes présents dans notre tube digestif, est très important pour la physiologie digestive et a été retrouvé modifié chez les individus avec TSA. Ce microbiote intestinal est incroyablement intégré à son environnement et est en dialogue constant avec le système digestif (siège du SNE), lui-même en dialogue constant avec le cerveau, formant à eux trois **l'axe microbiote-intestin-cerveau**. Cet axe pourrait alors être altéré dans l'autisme et contribuer aux troubles gastro-intestinaux associés.

Introduction générale

Ainsi, ma thèse apporte une contribution à la recherche sur l'origine des troubles gastro-intestinaux dans l'autisme en s'intéressant au SNE et à son fonctionnement sous l'influence de deux types de facteurs associés aux TSA. L'un plutôt génétique, s'intéresse à l'action de la sémaphorine 5A et d'une de ses mutations retrouvées dans l'autisme sur le fonctionnement du SNE. L'autre, environnemental, s'intéresse à l'impact de métabolites du microbiote intestinal, les acides billiaires secondaires, sur le fonctionnement du SNE. En effet, le microbiote intestinal est un acteur très important de la physiologie digestive et son altération dans le TSA pourrait contribuer aux troubles gastro-intestinaux si fréquemment retrouvés dans l'autisme.

Etude bibliographique

Chapitre 1: Le Système nerveux entérique

“Once dismissed as a simple collection of relay ganglia, the enteric nervous system is now recognized as a complex, integrative brain in its own right”

Gershon, 1999

I. Introduction générale et contexte anatomique : Le système digestif

1. Anatomie du système digestif

Le système nerveux entérique (SNE) est le siège de la régulation des fonctions digestives. Pour appréhender l'importance du SNE dans la physiologie humaine, il est primordial de définir le système digestif ainsi que ses grandes fonctions dans la digestion.

Le système digestif, ou gastro-intestinal, définit le système d'organe capable de prendre la nourriture, d'en extraire les nutriments et l'énergie nécessaire à la croissance et survie de l'organisme et d'en évacuer les composés non assimilables. Le tube digestif mesure environ 8 mètres de long chez l'humain adulte et est composé, dans le sens rostro-caudal, de la bouche, du pharynx, de l'œsophage, de l'estomac et des intestins. Les intestins se divisent eux même en deux parties : l'intestin grêle, lui-même subdivisé en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon, et le gros intestin qui comporte le caecum, le colon (composé du colon ascendant, du côlon transverse, du colon descendant et du colon sigmoïde) et enfin, le rectum et l'anus (Fig. 1A). Tous sont en contact avec le milieu extérieur.

De l'œsophage à l'anus, le tube digestif est constitué de quatre couches tissulaires (Fig. 1B) de la plus interne à la plus externe (proche de la lumière intestinal) :

- **La tunique externe** : Appelée séreuse dans la cavité abdomino-pelvienne, elle désigne un tissu conjonctif lâche permettant le maintien des organes entre eux.
- **La tunique musculaire** : couche de fibres musculaires lisses longitudinales et circulaires responsables de la motricité digestive. Ces muscles produisent des contractions/relaxations, brassant les aliments et les propulsant le long du tube digestif (péristaltisme). Cette motricité digestive est notamment sous le contrôle du SNE présent au sein de cette tunique musculaire.
- **La sous-muqueuse** : tissu conjonctif lâche comportant une vascularisation et une innervation importante par le SNE, assurant l'approvisionnement en sang et en nerfs de la couche la plus interne : la muqueuse

- **La muqueuse** : la couche en contact direct avec l'extérieur et les aliments. Elle est composée de trois sous-couches distinctes :
 - *La muqueuse musculaire* : Fine couche de muscle permettant des mouvements fins de la muqueuse et favorisant l'absorption des nutriments.
 - *La lamina propria* : Tissu conjonctif lâche et vascularisé.
 - *L'épithélium* : Couche de cellules épithéliales qui tapisse la lumière du tube digestif et permet l'absorption des nutriments. La composition cellulaire de l'épithélium varie selon la partie du tube digestif concernée.

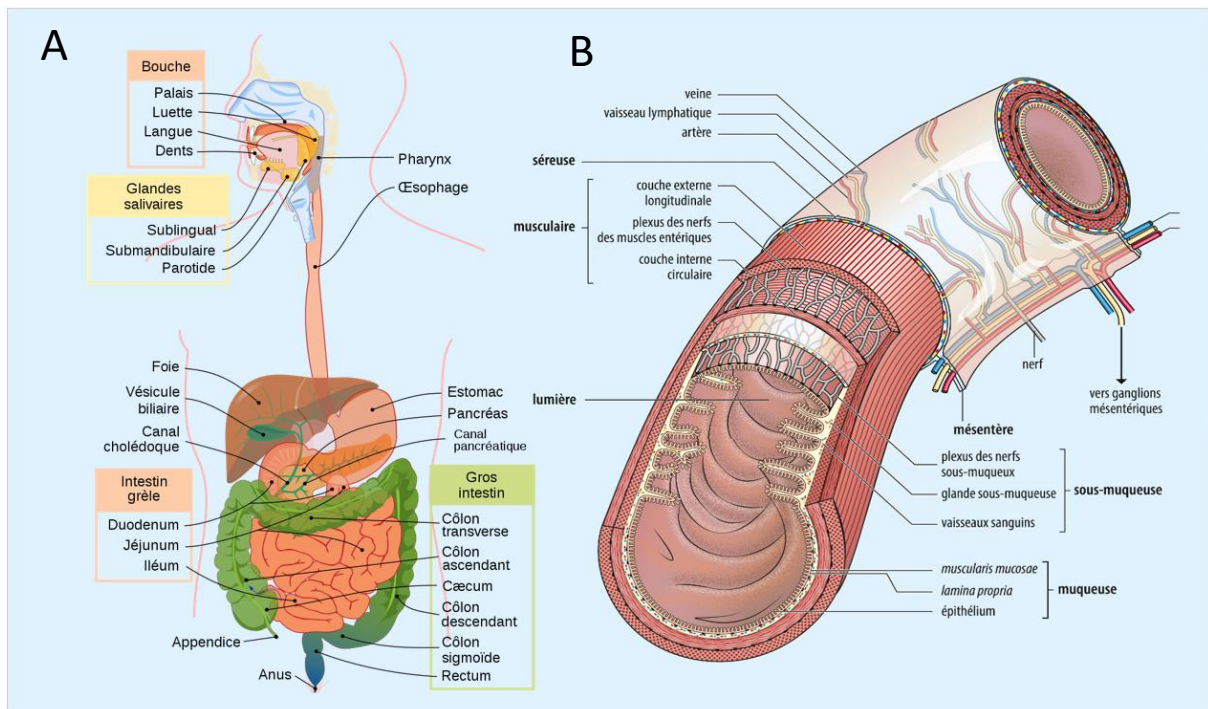


Figure 1 : (A) Anatomie du système digestif chez l'humain. Les organes digestifs primaires et secondaires y sont détaillés (Crédit : Illustration de Mariane Ruiz, libre de droits). (B) Schéma des différentes couches tissulaires constituant la paroi du tube digestif chez l'humain (Crédit: « Structure de l'intestin » Encyclopædia Universalis France)

2. La barrière épithéliale intestinale

a- Fonctions

La muqueuse contenant notamment l'épithélium est cruciale car en première ligne de front avec le milieu extérieur et le bolus alimentaire. Elle est appelée barrière épithéliale intestinale (BEI) de la partie basse de l'œsophage jusqu'au rectum. La BEI remplit ainsi une double fonction : d'une part, elle forme une barrière physique contre l'extérieur, et d'autre part, elle est la porte d'entrée des nutriments indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Cette complexité de fonctions peut être découpée en 3 grandes missions :

- **Protection contre les agents pathogène et les toxines** : La BEI joue un rôle essentiel dans la protection de l'organisme contre les agents pathogènes et les composés impropres à l'absorption. Elle produit un mucus protecteur qui recouvre les cellules épithéliales et agit comme lubrifiant et comme une barrière supplémentaire, haut lieu de nombreuses régulations et contrôles, surtout contre les bactéries pathogènes mais aussi commensales qui constituent le microbiote intestinal.
- **Point de contact avec le microbiote intestinal** : La BEI interagit intimement avec l'ensemble des micro-organismes qui tapissent le tractus intestinal, appelé microbiote intestinal. Cette interaction est essentielle et permet de maintenir une relation symbiotique entre ces micro-organismes et l'hôte et d'assurer le fonctionnement optimal de nombreuses fonctions physiologiques. Ce point sera exploré plus en détail dans le chapitre sur le microbiote intestinal.
- **Régulation de la perméabilité intestinale et de l'absorption des nutriments** : La BEI est sélectivement perméable, laissant passer ou non, certaines substances dans la circulation systémique. Parmi les molécules que laisse passer la BEI, nous retrouvons tous les nutriments essentiels provenant de la digestion des aliments.

b- Les cellules de la BEI

L'épithélial intestinal est composé de nombreux types de cellules épithéliales, assurant toutes différentes fonctions dans l'homéostasie digestive.

- **Les entérocytes** : Ce sont les cellules majoritaires de la BEI. Polarisées, elles possèdent un pôle apical comportant une multitude de microvillosités (cellule en brosse) augmentant leur surface de contact avec l'extérieur. C'est sur ces cellules que repose la perméabilité intestinale assurant la majorité de l'absorption des nutriments ou autres molécules qui passent par ces cellules.

- **Les cellules entéroendocrines** : Ne représentant que 1% des cellules de la BEI, elles sont dispersées tout le long du tractus intestinal, de l'estomac jusqu'au rectum. Ces cellules libèrent une grande diversité d'hormones jouant un rôle crucial dans la digestion et sont classées en fonction des molécules qu'elles produisent. On retrouve ainsi des cellules productrices de somatostatine (cellules D), de gastrine (cellules G) de ghréline (cellules P/D1), de cholécystokinine (cellules I), de sécrétine (cellules S), pour en citer les principales. Les plus abondantes restent les cellules productrices de sérotonine (cellules entérochromaffines) influençant la motricité digestive et la fonction de la barrière (Gribble & Reimann, 2016).

- **Les cellules caliciformes et les cellules de Paneth** : Ce sont deux autres types de cellules sécrétrices de la BEI. Les cellules caliciformes sont les principales productrices du mucus intestinal via la sécrétion de mucine, assurant protection et lubrification de la BEI (Peterson & Artis, 2014). Les cellules de Paneth, localisées au fond des cryptes épithéliales, produisent un cocktail de protéines antimicrobiennes cruciales pour la protection de la BEI contre les bactéries du microbiote intestinal (Peterson & Artis, 2014).

- **Autres cellules** : On retrouve également des cellules Tuft qui semblent jouer un rôle de sentinelle luminale et influencer la réponse immunitaire (Gerbe & Jay, 2016). D'autres cellules clairement impliquées dans la réponse immunitaire sont les cellules M (ou microfold). Les cellules M jouent un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire mucoale en transportant des antigènes et micro-organismes vers les tissus lymphoïdes sous-jacents (Nicoletti, 2000). Enfin, des cellules souches intestinales, localisées dans les cryptes intestinales, permettent d'assurer le renouvellement perpétuel de l'épithélium intestinal (tous les 3-5 jours chez l'humain). Ces dernières cellules ont la remarquable capacité de se différencier en tous les types de cellules de la BEI décrits précédemment. (Barker, 2014).

c- La perméabilité intestinale

La BEI est imperméable aux solutés hydrophiles, de sorte que les molécules et les nutriments ne peuvent la traverser que par le biais de transporteurs spécifiques. La perméabilité intestinale s'opère par deux voies principales :

La voie transcellulaire : Elle comprend des passages actifs par endocytose ou par des transporteurs spécifiques en fonction des molécules concernées. Un passage passif, ne consommant pas d'énergie et régit par les gradients électrochimiques est aussi présent. Ce passage se fait au travers de la membrane plasmique mais aussi au travers de canaux (Schoultz & Keita, 2020).

La voie paracellulaire : Contrôle le passage d'eau, d'ions et de molécules de faible poids moléculaire (<0.6 kDa *in vivo*) (Schoultz & Keita, 2020). Cette voie est régulée par des systèmes dynamiques de jonctions plus ou moins sélectifs. On y retrouve les jonctions serrées, des jonctions adhérentes, des desmosomes et des jonctions communicantes (*gap junction*) (Di Tommaso et al., 2021).

La perméabilité intestinale est cruciale dans le maintien de l'homéostasie digestive et, si compromise, peut être à l'origine de dysfonctionnements physiologiques et associée à des troubles gastro-intestinaux (Schoultz & Keita, 2020).

3. L'innervation du système digestif : Le SNE comme acteur principal

Pour assurer la régulation et la coordination d'un ensemble d'organes comme le système digestif, le vivant n'a jamais trouvé mieux que le système nerveux, n'en déplaise aux éponges privées de cette petite merveille.

Chez l'humain, le système nerveux (SN) se compose de deux grandes unités. La première unité est le système nerveux central (SNC) regroupant le cerveau et la moelle épinière, logés respectivement dans la boîte crânienne et la colonne vertébrale. La deuxième unité est le système nerveux périphérique (SNP) regroupant les nerfs et les ganglions nerveux situés en dehors du SNC. Le SNP est vaste et est lui-même divisé en 2 sous parties : le SN somatique, responsable notamment de la transmission et coordination des mouvements volontaires, et le SN autonome qui contrôle les fonctions involontaires du corps. Le SN autonome est subdivisé en trois parties : le système sympathique (associé au stress et à l'excitation), le système parasympathique (associé à la relaxation et au repos) et enfin, centre de régulation des grandes fonctions digestives, le système nerveux entérique (Furness, 2012 ; Langley, 1921).

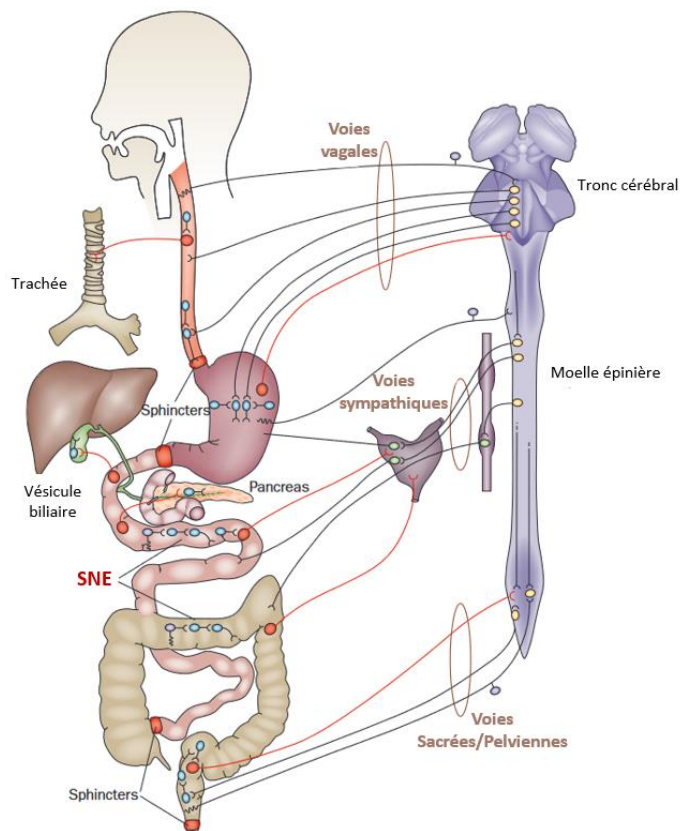


Figure 2 : Innervation du tractus gastro-intestinal. L'innervation extrinsèque se fait par deux voies majoritaires (voies noires): la voie sympathique et parasympathique (vagale et sacrée/pelviennne) L'innervation intrinsèque du tube digestif est assurée par le SNE. Les neurones du SNE sont représentés ici en bleu (motoneurones et interneurones), violet (neurones sensoriels) et rouge (neurones intestinofuges projetant notamment vers le SNC) Les différents types de neurones entériques sont détaillés plus loin dans le manuscrit). Adapté de Furness 2012

Le système digestif n'est pas exclusivement innervé par le SNE. Il reçoit deux autres types d'innervation du SNC : par le système parasympathique (voie vagale et sacrée/pelviennne) et par le système sympathique (mésentérique et cœliaque) (Fig. 2) (Furness, 2012). Ainsi, le SNC s'octroie quelques fonctions bien spécifiques dans la sphère digestive. Les mouvements du muscle strié de l'œsophage sont déterminés par des circuits neuronaux spécifiques dans le SNC entraînant la contraction rythmique et ordonnée du muscle, nécessaire au processus de déglutition. De même, le SNC joue un rôle majeur dans l'estomac, régulant son activité contractile et sa sécrétion d'acide par le biais de réflexes vago-vagaux. Le contrôle de la défécation est elle aussi régulée par le SNC, via les centres de défécation dans la moelle épinière lombosacrée (Furness et al., 2014). Toutefois, la déconnexion du système digestif au SNC ne constitue pas une urgence vitale et les grandes fonctions

digestives restent assurées efficacement par le SNE (Gershon, 1999). En dépit de cette remarquable indépendance, le SNE, en condition physiologique, ne fait pas cavalier seul et est ainsi en dialogue constant avec le SNC via des voies nerveuses ou humorales. Cette relation entre SNE-SNC qui constitue l'axe intestin cerveau sera détaillée plus loin dans ce manuscrit.

II. Le système nerveux entérique : Introduction et organisation

1. Historique de la découverte du SNE

Pour retracer l'histoire du SNE, nous pourrions remonter à des centaines de millions d'années, à l'apparition du SN chez les organismes pluricellulaires. En effet, les Cnidaires, animaux dont le SN peut être retracé le plus loin sur l'arbre phylogénétique, ne possèdent rien d'autre qu'une innervation au sein de leur tube digestif, suffisante pour assurer digestion et excrétion de leur aliments et leur survie depuis des millions d'années (Botàr, 1967). Aujourd'hui, tous les animaux existants qui ont des neurones ont un SNE, mais tous n'ont pas de SNC. Le développement d'un cerveau autonome pourrait représenter une seconde phase dans l'évolution, découlant des exigences des organismes vivants qui, au fil de leur évolution, requéraient des communications avec leur environnement de plus en plus complexes. Ainsi, sur une échelle temporelle, le SNE aujourd'hui qualifié de 2^{ème} cerveau, serait en fait le premier.

L'identification anatomique de ce cerveau primitif commence au 19^{ème} siècle avec l'observation de deux plexus nerveux majeurs au sein du tube digestif, le plexus de Meissner (ou sous-muqueux) en 1857 (Meissner, 1857) et le plexus d'Auerbach (ou myentérique) en 1864 (Auerbach, 1864) par les physiologistes allemands du même nom, G. Meissner et L. Auerbach. Plus tard, dans les années 1890, Santiago Ramon y Cajal distingua différents types de neurones dans la paroi intestinale, classifiés alors par le professeur russe A. S. Dogiel selon leur architecture et leur morphologie (Ramón y Cajal, 1893 ; Dogiel, 1899). Nous devons les premières explorations fonctionnelles du SNE aux anglais W.M. Bayliss and E.H. Starling, qui identifièrent le rôle d'un SN intrinsèque au tube digestif, sur le reflexe péristaltique des segments d'intestin grêle de chien, isolés du SNC. (Bayliss & Starling, 1899) Cette découverte fut confirmée 18 ans plus tard par le scientifique allemand P. Trendelenburg qui montra la présence du reflexe péristaltique *ex vivo* sur des segments isolés d'intestin de cochon d'inde (Trendelenburg, 1917). Quatre ans plus tard, le physiologiste anglais J.N. Langley fit mention pour la première fois du « système nerveux entérique » et le classifia comme une branche à part entière du SN autonome (Langley, 1921). C'est en 1999, que Michael D. Gershon, face à la complexité du SNE, le qualifie de « cerveau à part entière » (Gershon, 1999)

2. L'organisation en plexus du SNE

Avec ses quelques 400 à 600 millions de neurones, soit autant que dans la moelle épinière (Furness, 2006), et jusqu'à 6 fois plus de cellules gliales entériques (CGE) (Liu & Yang, 2022), le SNE est la division la plus complexe du SN périphérique. Neurones et CGE sont regroupés au sein de ganglions entériques, eux même interconnectés par des fibres interganglionnaires, formant un réseau de maillage, appelé plexus, innervant le tube digestif, du tiers inférieur de l'œsophage jusqu'au rectum (Furness, 2012).

Comme abordé précédemment, le SNE est constitué de deux plexus majeurs :

Le plexus myentérique (ou d'Auerbach) : situé entre les couches musculaires circulaires (internes) et longitudinales (externes) de la paroi intestinale (Fig. 3). Il est responsable de la coordination des mouvements musculaires du péristaltisme, essentiels pour assurer la progression régulière des aliments tout en facilitant leur brassage et leur mélange avec les sucs digestifs (Schemann & Neunlist, 2004).

Le plexus sous-muqueux (ou Meissner) : situé entre la muqueuse et la couche de cellules musculaires lisses circulaires (Fig. 3). Il est majoritairement présent dans l'intestin (Furness, 2000). Chez l'humain, ce plexus est composé de trois plexus distincts : le plexus sous-muqueux interne (Meissner) en contact avec la muqueuse juste en dessous de l'épithélium qui tapisse la paroi intestinale, le plexus sous-muqueux externe (plexus de Schabdasch ou de Henle) en contact avec le muscle lisse circulaire, et enfin, un plexus intermédiaire situé entre les deux (Hoyle & Burnstock, 1989; Schemann & Neunlist, 2004). Par simplicité, ces trois plexus seront réunis sous le terme de « plexus sous-muqueux ». Ce plexus est impliqué dans la régulation de la sécrétion de mucus protecteur, de fluides et d'enzymes nécessaires à la digestion. Il joue également un rôle dans l'absorption des nutriments à travers la paroi intestinale (Sharkey & Mawe, 2023). Cependant, il est à noter que cette ségrégation anatomo-fonctionnelle n'est pas aussi stricte. Certains neurones du plexus sous-muqueux externe innervent le muscle circulaire et des neurones du plexus myentérique de l'iléon humain projettent vers la muqueuse (Schemann & Neunlist, 2004).

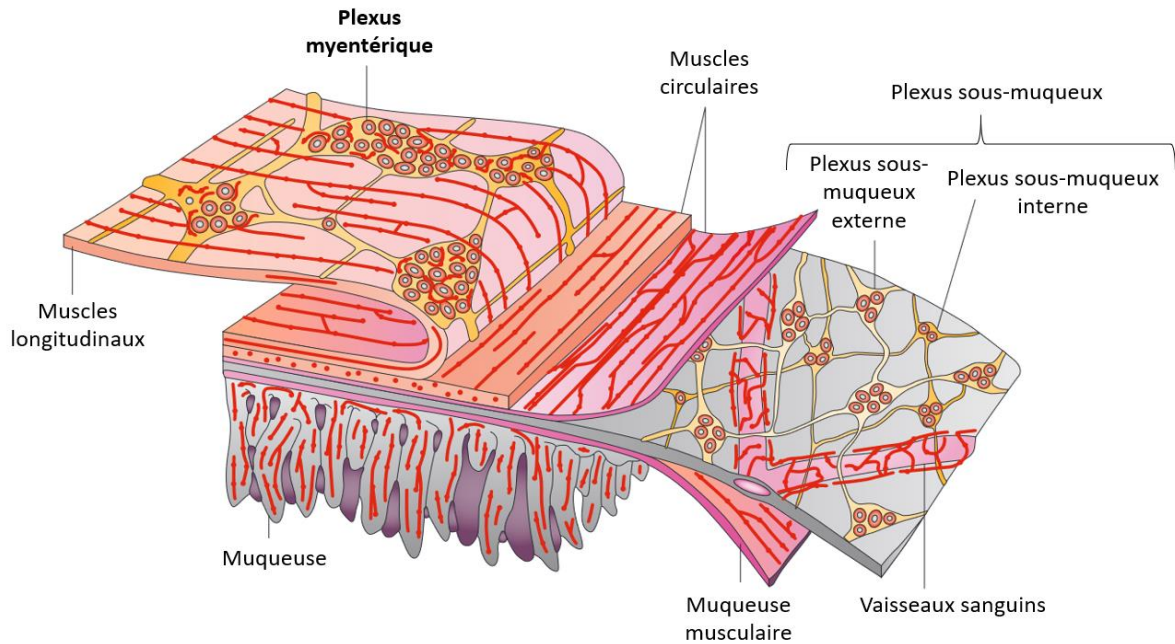


Figure 3 : L'organisation en plexus du SNE chez l'humain. Le SNE est composé de deux plexus principaux : le plexus myentérique situé entre les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires, et le plexus sous-muqueux situé entre la muqueuse et la couche musculaire lisse circulaire. Adapté de Furness 2012

3. Les neurones entériques

Le SNE est fort d'une grande diversité neuronale. Ces différents types de neurones ont été classifiés au fil des années selon leur morphologie, leurs propriétés électrophysiologiques et leurs fonctions.

a- Morphologie : La classification de Dogiel

A.S. Dogiel a réalisé la première classification en trois types en 1899, basée sur la morphologie du neurone ainsi que la longueur et la forme de ses prolongements (Dogiel, 1899). Le type I est caractérisé par un corps cellulaire mesurant entre 13 et 35 μm de long pour 9 à 22 μm de large et présentant un axone et de nombreuses dendrites courtes pouvant arborer 3 aspect différents (Fig. 4A): larges (Type I lamellaires ou « *stubby* »), fines (type I « *spiny* ») ou bien filamenteuses, désigné alors sous le nom type I « *hairy* ». Le type II est un peu plus grand que le type I, mesurant 22-47 μm de long pour 13-22 μm de large et possède plusieurs axones avec ou sans prolongements dendritiques (Fig.4B). Enfin, le neurone entérique de type III présente un axone avec un embranchement dendritique bien développé (Fig. 4C) (Furness et Barton, 2008 ; Brehmer, 2021). Par la suite, les méthodes de marquages histologiques s'améliorant, les sous type VI, V, VI et VII ont été décrits dans les années 1980-90 notamment grâce aux travaux de W. Stach et Brehmer (Brehmer & Stach,1998 ; Brehmer, 2021).

Le type V regroupe des neurones uni-axonal, présents dans le plexus myentérique et présentant un prolongement à l'aspect d'une tige d'où l'axone et de multiples dendrites ramifiées émergent (Fig. 4D) (Furness & Barton, 2008 ; Brehmer et al., 2004 ; Brehmer, 2021). Face à cette diversité, il est important de noter que les types I, II et III constituent la grande majorité des neurones entériques du SNE (Furness, 2000).

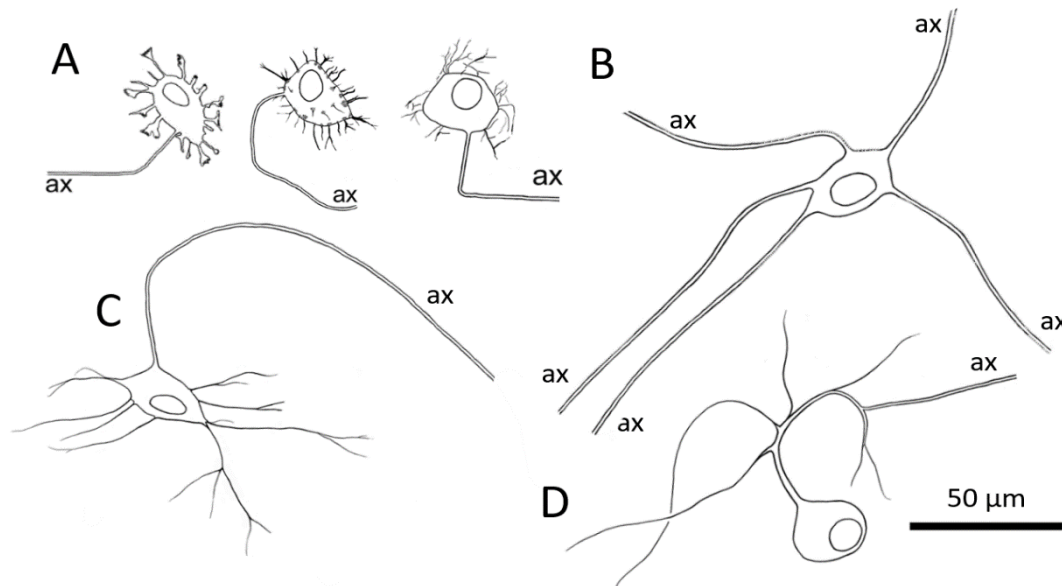


Figure 4 : Morphologies des neurones entériques selon la classification de Dogiel. ax = axone. (A) Dogiel type I : de gauche à droite : lamellaire, *spiny* et *hairy*. (B) Dogiel type II, neurone multi axones (C) Dogiel type III à l'embranchement dendritique bien développé. (D) Dogiel type V présentant un prolongement à l'aspect d'une tige d'où l'axone et de multiples dendrites ramifiées émergent. Adapté de Brehmer 2021

b- Propriétés électrophysiologiques

Il existe deux grandes classes de neurones basées sur leurs propriétés électrophysiologiques, et plus précisément, la durée de leur phase d'hyperpolarisation post stimulation par un potentiel d'action. La première classe « S » (pour « *synaptic input* ») se caractérise par un potentiel post-synaptique rapide et une phase d'hyperpolarisation courte (Fig. 5A). La deuxième classe « AH » (pour « *after-hyperpolarization* ») se caractérise par un potentiel post-synaptique rapide et une phase d'hyperpolarisation longue (Fig. 5B) (Hirst et al., 1974). Les neurones aux propriétés électrophysiologiques S ont principalement une morphologie de type Dogiel I et les neurones AH une morphologie de type Dogiel II (Messenger, 1994 ; Carbone et al., 2014). Une dernière classe existe, appelé « LT » pour « *Low-threshold* » qui caractérise des neurones avec un seuil d'excitation bas, capable de générer des potentiels d'action de façon spontanée sans stimulation. Cependant, cette

dernière classe n'a été identifiée que dans le plexus sous-muqueux du cochon d'inde (Lomax et al., 2001).

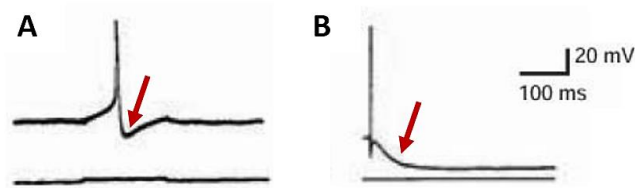


Figure 5 : Enregistrement électrophysiologique d'un neurone « S » (A) et d'un neurone « AH » (B) après génération d'un potentiel d'action. Les flèches rouges présentent la phase d'hyperpolarisation, courte en A et longue en B. Enregistrement réalisés dans l'intestin grêle de cochon d'inde. Figure adaptée de Furness (2008)

c- Les sous-types fonctionnels des neurones entériques

Une dernière manière de classifier les neurones entériques repose sur leur rôle spécifique dans la régulation des fonctions digestives. Cette classification prend aussi en compte l'expression des neurotransmetteurs et des récepteurs permettant de distinguer trois grandes familles de neurones : les neurones sensoriels, les neurones moteurs et les interneurones (Furness, 2012)

Les neurones sensoriels :

Les neurones sensoriels sont des neurones afférents, ils transmettent des informations sensorielles à divers cibles intégratrices. De manière unique parmi les organes périphériques, l'intestin possède des neurones sensoriels intrinsèques appelés **IPANs** (« *Intrinsic Primary Afferent Neurons*») dont les corps cellulaires et prolongement se trouvent dans les plexus entériques et qui ne projettent pas vers le système nerveux central. Ces neurones représentent environ 20% des neurones entériques (Furness, 2000). Ils détectent des événements intestinaux (mécaniques ou chimiques) et initient des réflexes essentiels dans le contrôle des fonctions digestives comme les réflexes de motricité, de sécrétomotricité et de vasomotricité via des voies réflexes intrinsèques qui sont également entièrement contenues à l'intérieur de la paroi intestinale (Furness, 2006). Les IPANs sont de classe électrophysiologique AH et ont une morphologie Dogiel de type II comme prédit par Dogiel lors de ses descriptions. En effet, Dogiel devina que ces grands neurones aux multiples axones devaient être des neurones sensoriels primaires (Dogiel, 1899).

Les IPANs ne sont pas tous sensibles aux mêmes stimuli. Certains sont mécanosensibles, répondant à l'étirement et la distorsion de la paroi intestinale, et d'autres sont chémosensibles répondant à des changements de composition luminaire (Furness, 2006). Les changements de la composition luminaire et la distorsion mécanique de la muqueuse ne sont pas détectés directement par les IPANs du plexus sous-muqueux mais par les cellules entéro-endocrines de la muqueuse

intestinale, qui activent les IPANs via la libération de sérotonine (5-HT) (Furness, 2006 ; Sharkey & Mawe, 2023).

Un autre type de neurones sensoriel, bien plus minoritaire, est retrouvé dans le plexus myentérique, ce sont les **neurones intestinofuges** dont l'axone quitte l'intestin et projette vers les ganglions sympathiques, la moelle épinière et les noyaux dorsaux du nerf vague dans le tronc cérébral (neurones rouges dans la Fig.2) (Furness et al., 2003 ; Furness, 2012). Ces neurones sensoriels peuvent être primaires ou secondaires et sont sensibles à la distension intestinale (volume) (Furness et al., 2003 ; Hibberd et al., 2012).

Les motoneurones :

Il existe 5 types de motoneurones dans le SNE : Les neurones moteurs excitateurs ou inhibiteurs du muscle lisse intestinal, les neurones sécrétomoteurs avec ou sans action vasodilatatrice et enfin, les neurones innervant les cellules entéro-endocrines (Hansen, 2003). Tous ces motoneurones sont majoritairement de morphologie Dogiel de type I et de classe électrophysiologique S (Sharkey & Mawe, 2023). Les motoneurones excitateurs et inhibiteurs musculaires régulent l'activité des muscles lisses et sont majoritairement situés dans le plexus myentérique (une minorité réside dans le plexus sous-muqueux) (Furness et al., 2014). Les neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs régulent la sécrétion d'eau, d'électrolytes et le flux sanguin. Leur corps cellulaires résident principalement dans le plexus sous-muqueux et projettent leurs axones vers la muqueuse ou le plexus myentérique.

Les interneurones :

Les interneurones sont plus difficiles à étudier sur le plan physiologique que les autres neurones, cependant deux catégories d'interneurones ont été identifiées dans le SNE : les interneurones ascendants, dont l'axone projette dans le sens oral, et les interneurones descendants, projetant dans le sens anal (Furness et al., 2014). Le nombre d'interneurones varie en fonction de la région du tube digestif mais au moins un type d'interneurone ascendant et trois types de descendant (classés selon leur codage neurochimique) ont été décrits dans le plexus myentérique (Hansen, 2003). Ces neurones sont impliqués dans les réflexes péristaltiques locaux et les réflexes sécrétomoteurs. Les interneurones ascendants et descendants sont respectivement et majoritairement de morphologie Dogiel type I et de classe électrophysiologique S, et Dogiel type II et classe S ou AH (Brookes, 2001).

d- Codage neurochimique des neurones du SNE

Les neurones entériques font preuve d'une grande diversité neurochimique. Le tableau 1 adapté de l'excellente revue de Sharkey & Mawe 2023 récapitule les neurotransmetteurs et co-transmetteurs des différents types de neurones entériques décrits précédemment, dans l'intestin grêle et le gros intestin. (Tableau 1).

Type de neurones	Neurotransmetteur principal	Neurotransmetteurs secondaires	Codage neurochimique
IPANs	ACh, CGRP	neuromedin U, calretinin, calbindin, tachykinin	CGRP/neuromedin U
Neurones intestinofuges	ACh	VIP, GRP, CART, CCK	Non décrit
Neurones moteurs excitateurs	ACh	Tachykinin, enkephalin, GABA, calretinin	ChAT/tachykinin, ChAT/Calretinin
Neurones moteurs inhibiteurs	Nitric oxide	VIP, ATP, enkephalin, NPY, GABA	NOS/VIP
Neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs	VIP	Galanin, CART, dynorphin	VIP/GAL
Neurones sécrétomoteurs cholinergique	ACh	NPY	ChAT/NPY
Interneurones ascendants	ACh	Calretinin, enkephalin, tachykinin, Calbindin	ChAT/Calretinin
Interneurones descendant	ACh	5-HT, somatostatin, VIP, NPY, nitric oxide	ChAT/5-HT, ChAT/ somatostatin, ChAT/VIP, NOS/VIP

Tableau 1: La nature neurochimique des neurones entérique a principalement été établie chez le cochon d'inde. Cependant, de plus en plus de données sont recueillies chez le modèle murin et l'humain. Ce tableau n'est pas nécessairement valable pour toutes les espèces mais il retranscrit les identités neurochimiques majoritaires chez les neurones entériques de l'intestin. **5-HT** : sérotonine ; **ACh** : acétylcholine ; **ATP** : adénosine triphosphate ; **CART** : transcript régulé par la cocaïne et l'amphétamine (neuropeptide) ; **CGRP** : peptide lié au gène de la calcitonine ; **ChAT** : choline acétyltransférase ; **GABA** : acide gamma-aminobutyrique ; **GAL** : galanine ; **GRP** : peptide libérant la gastrine ; **NOS** : oxyde nitrique synthase ; **NPY** : neuropeptide Y ; **VIP** : peptide intestinal vasoactif. Adapté de Sharkey & Mawe 2023.

4. Les cellules gliales entériques (CGE)

Les CGE font partie intégrante du SNE et dominant largement en nombre les neurones entériques. Ces cellules, décrites dès 1899 par Dogiel, ont la même origine embryonnaire que les neurones entériques (Nagy & Goldstein, 2017). Elles proviennent des cellules de la crête neurale (pour un petit avant-goût de la partie suivante sur le développement du SNE) et à l'image de leurs comparses du SNC (en particulier les astrocytes), ont un rôle essentiel dans la survie et le bon fonctionnement des neurones qu'elles entourent.

a- Les types de CGE

Les CGE sont divisées en quatre types selon leur morphologie et localisation dans les plexus entériques. Bien que toutes les populations de CGE semblent dérivées des mêmes progéniteurs, la localisation finale dans l'intestin ainsi que le contexte physiologique et le microenvironnement semblent dicter le phénotype final en l'un de ces 4 types de CGE décrits ci-après (Dulac & Le Douarin 1991 ; Gulbransen & Sharkey, 2012) :

- **Type I** : De morphologie étoilée et protoplasmique (prolongement courts et épais), ces CGE sont associées aux neurones du plexus myentérique et sous muqueux (Fig.6A).
- **Type II** : De morphologie allongées et fibreuses, ces CGE sont en contact direct avec les fibres nerveuses inter ganglionnaires (Fig.6B).
- **Type III** : De morphologie multipolaire, ces CGE présentent de longs prolongements majeurs et plusieurs prolongements secondaires. Elles sont présentes dans les plexus entériques et dans la muqueuse intestinale (Fig.6C).
- **Type IV** : De morphologie allongées et bipolaires, ces CGE sont associées aux fibres nerveuses dans les couches musculaires lisses (Fig.6D).

Il est à noter que cette diversité de CGE n'a pas (encore) été mise en relation avec des fonctions et comportements cellulaires spécifiques dans le SNE (Baghdadi & Kim, 2023).

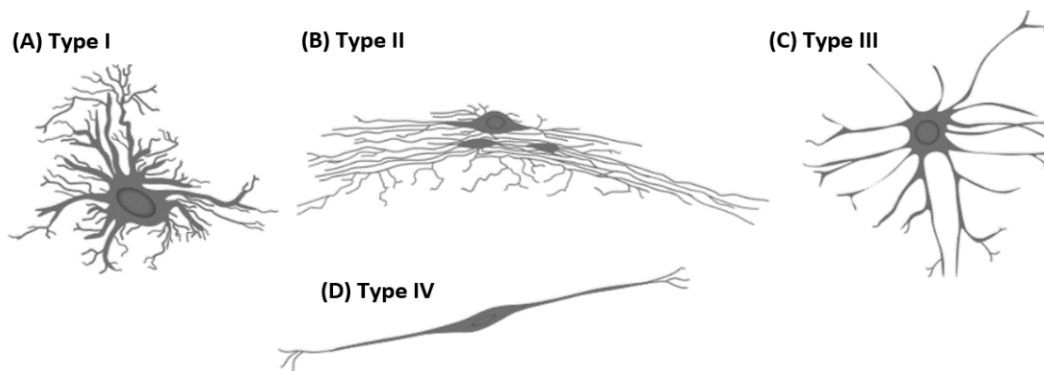


Figure 6 : Représentation des différents types morphologique de glie entérique. Adapté de Gulbransen & Sharkey, 2012

b- Les rôles des CGE

La survie neuronale : Les CGE ont un effet protecteur et trophique sur les neurones entériques. En effet, elles sont capables de produire des molécules luttant contre le stress oxydant comme la prostaglandine 15dPGJ2 et le glutathion (Abdo et al., 2012). Les CGE produisent aussi le facteur de croissance GDNF (*Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*) promouvant la survie neuronale. Elles protègent aussi les neurones de l'excitotoxicité en produisant des enzymes et transporteurs pour limiter l'effet des molécules neuroactives comme le glutamate ou l'ATP (Gulbransen & Sharkey, 2012).

La neurotransmission : Les CGE jouent un rôle clé dans la régulation de la neurotransmission dans le SNE. Elles dégradent les neurotransmetteurs en excès et les recaptent via des transporteurs spécifiques (Gulbransen & Sharkey, 2012). Les CGE expriment des récepteurs à plusieurs neuromédiateurs et neuromodulateurs, les rendant capable « d'écouter les conversations » des neurones entériques, et même d'y participer en libérant des gliotransmetteurs (ATP, GABA). Les CGE

pourraient aussi fournir des précurseurs pour la synthèse de neurotransmetteurs par les neurones, mais cela reste à démontrer physiologiquement (Baghdadi & Kim, 2023).

Fonction immunitaire : Les CGE ont aussi un fort rôle dans l’immunité de l’intestin. Les CGE ne sont pas des cellules immunitaires mais sont capables de sécréter une variété de cytokines et chimiokines en réponse à des stress immunitaires. Elles sont aussi impliquées dans la régulation de l’activation des macrophages dans la muqueuses intestinale (Gulbransen & Sharkey, 2012) et sont capables de produire des facteurs trophiques comme le NGF (*Nerve Growth Factor*) lors d’une réponse inflammatoire, pour soutenir la survie neuronale (Baghdadi & Kim, 2023).

5. Les marqueurs moléculaires du SNE

Les marqueurs neuronaux et gliaux les plus couramment utilisés dans le SNE sont regroupés dans le tableau suivant (tableau 2).

	Nom du marqueur	Rôle	Localisation	Références
Neuronal	Hu C/D	Protéine HuC et HuD Régulateurs de transcription	Corps cellulaire et noyaux	Caillaud <i>et al.</i> , 2023
	PGP9.5	Impliquée dans l’hydrolyse de l’ubiquitine	Corps cellulaire et prolongements	Neunlist & Schemann, 2014
	Beta III tubulin	Protéine de cytosquelette (microtubule)	Corps cellulaire et prolongements	Gonzales <i>et al.</i> , 2020
	MAP-2 (<i>Microtubule Associated Protein-2</i>)	Protéine de cytosquelette enrichie dans les dendrites	Corps cellulaire et prolongements (dendrite ++)	Kimball & Mulholland, 1995
	Synapsin 1	Protéine pré-synaptique	Terminaisons synaptiques	Gonzales <i>et al.</i> , 2020
Glial	S100β	Protéine de liaison au calcium (Régulation de nombreux processus cellulaires)	Corps cellulaire et prolongements	Boesmans <i>et al.</i> , 2015
	PLP1 (<i>proteolipid protein 1</i>)	Protéolipide impliquée dans la myélinisation *	Corps cellulaire et prolongements	Rao <i>et al.</i> , 2015

Tableau 2 : Marqueurs moléculaires principaux du SNE. *PLP1 est exprimé spécifiquement par les CGE bien qu’il n’y ait aucune preuve de myélinisation dans le SNE (Rao *et al.*, 2015) Le marqueur glial GFAP est aussi utilisé mais n’est exprimé que par une portion plus réduite des CGE

III. Rôle du SNE dans les fonctions digestives

Le SNE est l’acteur principal dans le contrôle des fonctions digestives. Cet aspect a déjà été abordée au travers de la description du SNE mais mérite une description plus détaillée sur le rôle du SNE dans les 3 grandes fonctions digestives majeures : La motricité digestive, la sécrétion de molécules cruciales pour la régulation et le fonctionnement de la digestion, et enfin, la régulation de la BEI.

1. Contrôle de la motricité digestive

La motricité digestive regroupe l'ensemble des mouvements coordonnés des muscles lisses de l'intestin (Rao, 2020). Cette motricité présente une grande diversité de schémas de mouvements, différents en fonction de la région du tractus digestif et répondant aux diverses fonctions d'absorption, de stockage et de vidange des organes digestifs. On y retrouve ainsi, le péristaltisme (propulsion orthograde rapide des aliments lors de prises alimentaires), la segmentation et les mouvements de brassage des aliments, les complexes migratoires moteurs (propulsion orthograde lente en période interprandiale) et enfin, la rétropulsion (expulsion rétrograde des substances détectées comme nocives. Ex : vomissement) (Furness, 2012).

Le schéma moteur du péristaltisme est très bien décrit dans l'intestin : il se déclenche lorsqu'un stimulus luminal chimique ou mécanique survient au passage du bol alimentaire. Les neurones afférents primaires intrinsèques (IPAN) stimulés provoquent l'activation des interneurons ascendants qui font synapse avec les neurones moteurs excitateurs, déclenchant ainsi une contraction dans le sens oral, tandis que l'activation des interneurons descendants entraîne l'excitation des neurones moteurs inhibiteurs, provoquant une relaxation dans le sens anal. Ce circuit réflexe polarisé permet de développer un gradient de pression qui propulse les contenus digestifs dans le sens oro-anal (Furness et al., 2014 ; Sharkey & Mawe 2023) (Fig. 7).

Les complexes migratoires moteurs quant à eux, interviennent dans l'intestin en phase de jeûne et permet de nettoyer le tube digestif des débris grâce à des vagues de contraction très lentes (1 à 4 cm par minute) toutes les 90 min environ (ce sont ces contractions qui sont responsables des gargouillis de notre ventre quand nous avons faim) (Furness, 2012). Ces mouvements stoppent dès une nouvelle prise alimentaire pour laisser place aux mouvements de péristaltisme et de segmentation.

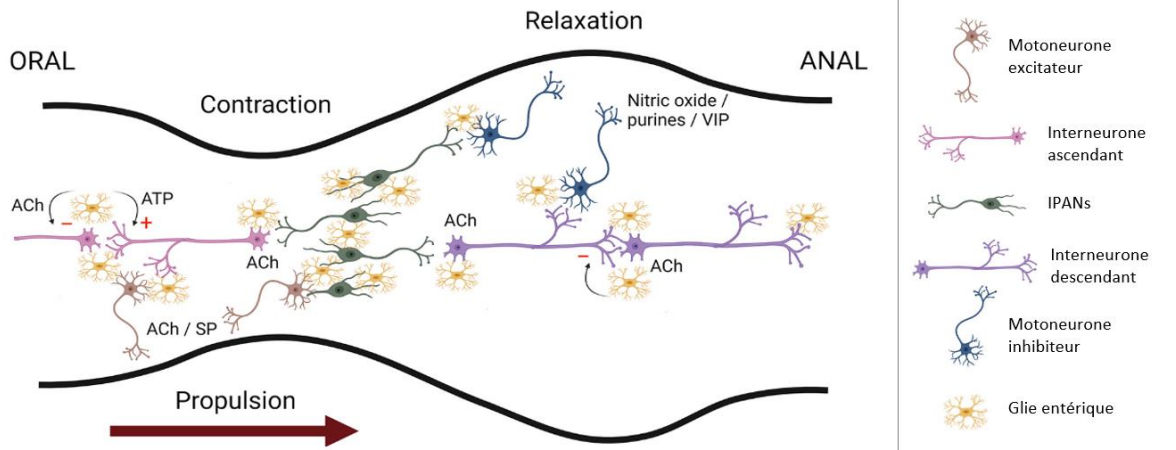


Figure 7 : Schéma du circuit moteur contrôlant le muscle circulaire principal acteur du péristaltisme. Suite à un stimulus luminal chimique ou mécanique lors du passage du bol alimentaire, les IPANs activent les interneurons ascendants et descendants, qui excitent respectivement des neurones moteurs excitateurs et des neurones moteurs inhibiteurs provoquant une contraction en amont de la stimulation et une relaxation en aval. Ce circuit réflexe polarisé permet la création d'un gradient de pression qui propulse le contenu dans le sens oro-anale. Les principaux neurotransmetteurs impliqués comprennent l'acétylcholine (ACh) pour toutes les voies, sauf pour les neurones moteurs inhibiteurs qui utilisent l'oxyde nitrique et les nucléotides puriques comme principaux neurotransmetteurs. La substance P (SP) fournit un complément important à l'innervation excitatrice du muscle lisse ; de même, le peptide intestinal vasoactif (VIP) intervient dans l'innervation inhibitrice du muscle lisse. Les cellules gliales entériques jouent également un rôle actif dans la régulation de la motricité intestinale. Schéma de Sharkey & Mawe, 2023

Pour assurer la coordination rythmée des mouvements musculaires, les neurones entériques ont besoin du soutien de cellules interstitielles pacemaker qui sont présentes dans la paroi du tube digestif. Ces cellules appelées cellules interstitielles de Cajal (CIC) forment des *gap junctions* avec les cellules musculaires et par leur activité spontanée rythmée, servent de métronome aux contractions musculaires lentes, cruciales dans l'avancée du bol alimentaire (Foong et al., 2020). Les CIC sont en relation étroite avec les terminaisons nerveuses des neurones entériques et expriment des récepteurs aux neurotransmetteurs du SNE. Les CIC peuvent ainsi être modulées par les neurones entériques et servent notamment d'amplificateur du message nerveux dans la contraction musculaire (Ward & Sanders, 2001).

2. Contrôle de l'activité sécrétoire

Les neurones sécrétomoteurs abordés précédemment sont cruciaux dans la régulation des fluides dans le tractus digestif et le maintien de l'homéostasie du corps entier. Ils interviennent dans le réflexe entérique sécrétomoteur permettant la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale en réponse à un changement d'homéostasie (de par l'absorption de nutriments par exemple) (Furness et al., 2004). Ce réflexe qui fait intervenir les IPANs permet aussi de réguler le pH de la lumière digestive

par la sécrétion de Cl^- ou de bicarbonate (Flemström, 1986). Certains pathogènes et toxines, comme la toxine du choléra produite par la bactérie *Vibrio cholerae*, hyperactivent ces reflexes sécréteurs, induisant alors des diarrhées, utiles pour vider et nettoyer le tractus de l'agent pathogène mais pouvant être extrêmement dangereuses pour l'homéostasie du corps si trop sévères (Furness, 2012).

Plus précisément, certaines cellules entéroendocrines de la BEI sont sous le contrôle direct ou indirect du SNE. C'est le cas de la sécrétion de la gastrine par les cellules G, une hormone impliquée dans la régulation de la sécrétion d'acide dans l'estomac. Cette sécrétion est sous le contrôle de la *gastrin-releasing peptide*, libérée par les neurones entériques innervant les cellules G (Furness, 2012 ; Furness, 2014).

3. Contrôle de la BEI

Un nombre grandissant d'études s'est penché sur le rôle du SNE sur la régulation des fonctions de la BEI et notamment sur la régulation de la perméabilité intestinale.

Une étude *in vitro* utilisant un modèle de co-culture de plexus sous muqueux humain et de monocouches de cellules épithéliales intestinales a démontré que la stimulation électrique des neurones entériques réduit la perméabilité paracellulaire (Neunlist et al., 2003). De la même manière, la stimulation du nerf vague, qui active *in fine* les neurones entériques, module également la perméabilité intestinale (Greenwood & Mantle, 1992). Ces effets semblent être médiés par les neurotransmetteurs du SNE. On retrouve ainsi l'acétylcholine augmentant à la fois la perméabilité paracellulaire et transcellulaire (Greenwood & Mantle, 1992 ; Cameron & Perdue, 2007) et la substance P qui augmente la perméabilité paracellulaire (Neunlist et al., 2013). Le VIP, quant à lui, induit une diminution de la perméabilité paracellulaire dans différentes lignées cellulaires épithéliales intestinales (Neunlist et al., 2013). Le VIP prévient également et/ou réduit l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite soit par des neuromédiateurs (comme la substance P) ou des médiateurs inflammatoires, ou agents pathogènes (Neunlist et al., 2013). De plus, la réduction de la perméabilité paracellulaire induite par la stimulation électrique des neurones entériques est prévenue par des antagonistes du VIP confirmant ainsi l'implication du VIP comme régulateur clé de la BEI (Neunlist et al., 2003).

Ces neuromédiateurs libérés par les neurones entériques ont aussi une action sur d'autres fonction de la BEI. Ainsi, le VIP possède une action anti-prolifératrice sur les cellules de la BEI (Toumi et al., 2003) et à l'inverse, l'acétylcholine et la substance P ont été montrées comme promoteur de la prolifération cellulaire. Les neurones sérotoninergiques du SNE sont capables de promouvoir la croissance épithéliale via la libération de 5-HT et l'activation du récepteur 5-HT_{2A} présents sur les

neurones cholinergiques (Neunlist et al., 2013). Ces modifications peuvent être sur le court ou long terme, impliquant des modifications post-traductionnelles ou bien la régulation d'expression de protéines clés des jonctions de la BEI (Zonula occludens-1 ou ZO-1). Ainsi, le SNE participe à la régulation fine des fonctions de la BEI.

IV. Le développement et maturation du SNE

1. Migration et colonisation des précurseurs du SNE

Chez l'humain, comme chez tous les vertébrés, le SNE dérive majoritairement des cellules des crêtes neurales vagues (CCNV) adjacentes aux somites 1-7. Ces CCNV vont contribuer à la formation du tissu cardiaque (majoritairement CCNV des somites 1-4) et du SNE (majoritairement somites 4-7) (Hutchins et al., 2018). Bien décrite chez la souris et le poulet, la mise en place du SNE chez l'humain comporte encore plusieurs parts d'ombre que des difficultés éthiques évidentes freinent à dissiper. Dans cette partie suivante, on parlera du développement du SNE chez la souris, sauf indication contraire.

Dès la 4^{ème} semaine de gestation chez l'humain et au 9^{ème} jour de gestation chez la souris (*Embryonic day 9 - E9*), les CCNV initient une migration rostro-caudale pour venir coloniser l'intégrité de la paroi du tube digestif (Fu et al., 2003). Ces cellules deviennent alors des progéniteurs de cellules neurales entériques (PCNEs). Cette migration se termine à la 7^{ème} semaine chez l'humain et le 15^{ème} jour de gestation chez la souris et se fait à une vitesse allant jusqu'à 35µm/h alors que le tube digestif est toujours en élongation et en formation (Anderson et al., 2006) (Fig. 8A). Des défauts de migration des PCNEs conduisent à des pathologies intestinales. C'est le cas de la maladie de Hirschsprung, une maladie congénitale grave due à un arrêt précoce de la migration et/ou de prolifération des progéniteurs vagues et caractérisée par l'absence d'innervation de la partie distale de l'intestin et du colon.

Arrivées au caecum, où l'intestin forme une boucle, une partie des PCNEs se réorientent vers une voie plus directe, de façon trans-mésenchymale pour atteindre l'intestin postérieur (qui donnera le colon et le rectum) et participer au SNE de cette région. (Nishiyama et al., 2012) (Fig. 8B-B'). L'existence de ce phénomène, observé chez la souris, a longtemps été incertain chez l'humain, mais récemment, une étude a montré que ces cellules trans-mésenchymales pourraient être responsables des « *skip segments* » observés dans la maladie de Hirschsprung. Ces « *skip segments* » correspondent à l'existence de segments innervés au sein de la partie pathologiquement non innervée de l'intestin (Yu et al., 2021).

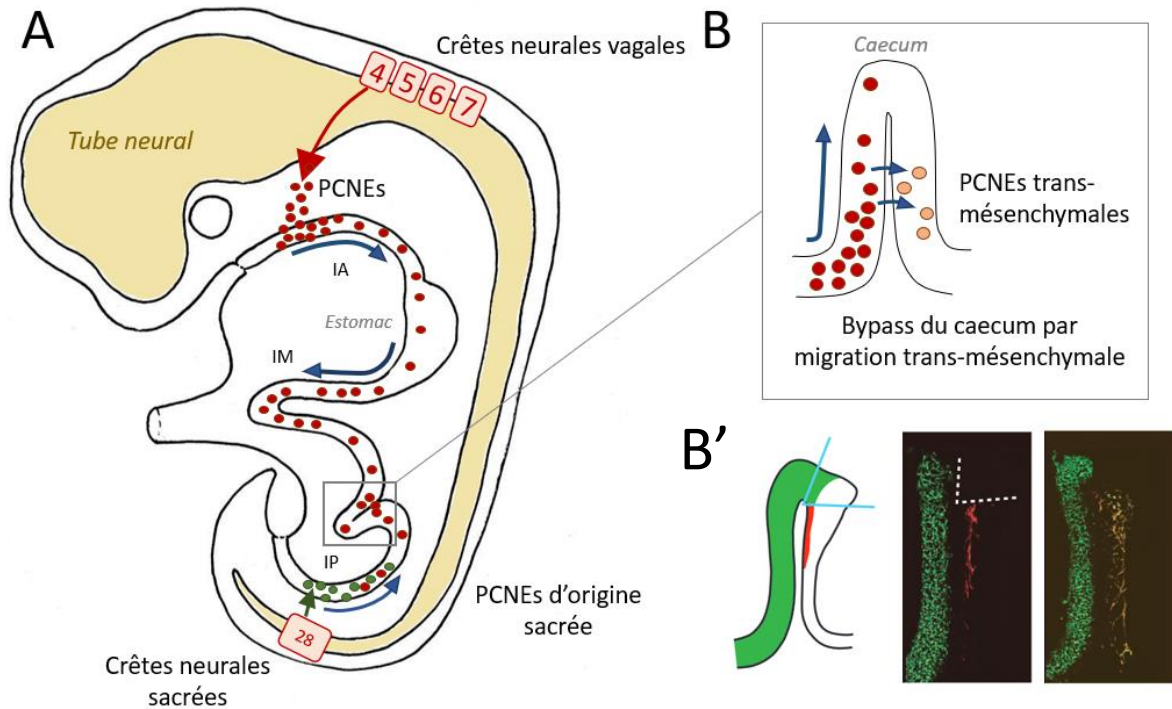


Figure 8 : Migration des progéniteurs dérivés des crêtes neurales dans l'intestin embryonnaire. **(A)** Les cellules dérivées de la crête neurale migrent à partir de la zone vagale (somites 4 à 7 majoritairement) dans un sens rostro-caudal permettant la mise en place du système nerveux entérique de l'œsophage au caecum principalement (rouge). A l'opposé, d'autres proviennent de la zone sacrée (somite 28) et migrent dans un sens caudo-rostral permettant la mise en place du système nerveux entérique dans le colon distal (vert). PCNEs = progéniteurs de cellules nerveuses entériques, IA = Intestin antérieur, IM= Intestin moyen, IP= Intestin postérieur. **(B)** Arrivées au caecum qui forme une boucle, les PCNEs continue leur migration dans le sens rostro-caudal mais une partie se mettent à migrer trans-mésenchymalement, bypassant le caecum et arrivant alors devant le front de migration (orange). **(B')** Observation de cette migration trans-mésenchymale par Nishiyama et al., 2012. Le caecum est lésé à E11, 5 coupant le chemin aux PCNEs suivants la migration traditionnelle rostro-caudal. 27h post lésion, des PCNEs ayant migrés latéralement au travers du mésoenchyme sont visible de l'autre côté. Composition originale à partir de Nagy & Goldstein, 2017 ; Lake & Heuckeroth, 2013 ; Nishiyama et al., 2012

Les CCNV ne sont pas les seules cellules contribuant au SNE. Comme observé chez la souris, les cellules des crêtes neurales sacrées (somites 28) délaminent à partir de E9,5, pénètrent le mésoenchyme de la partie distale de l'intestin postérieur à E13,5 et migrent de manière caudo-rostrale pour coloniser l'intestin postérieur, rejoignant les CCNV (d'origine vagale) (Burns & Le Douarin, 1998 ; Wang et al., 2011). Les précurseurs sacrés contribuent à environ 15% des précurseurs du SNE dans la partie distale de l'intestin postérieur chez la souris (Wang et al., 2011). Chez l'humain, cette contribution sacrée est plus disputée et l'étendue de sa contribution est encore très mal connue.

Une seconde vague de migration a lieu à partir de E15,5 chez la souris et à partir de la 8^{ème} semaine chez l'humain (Uesaka et al., 2013 ; Wallace & Burns 2005). Les progéniteurs ayant colonisé les couches supérieures du mésoenchyme (formant le futur plexus myentérique), vont alors coloniser,

de manière centripète, les couches les plus internes (proche du futur lumen) pour former le futur plexus sous-muqueux.

La migration des PCNEs est dirigée à la fois de manière passive, par le microenvironnement permissif à la migration, et à la fois de manière active grâce à la libération de molécules chimiotactiques par les populations cellulaires du mésenchyme intestinal. Par exemple, la deuxième vague de migration est déclenchée et guidée par des facteurs trophiques attractants libérés par l'épithélium intestinal (Netrin 1 et Netrin 3) (Lake & Heuckeroth, 2013). La migration des PCNEs s'accompagne également d'une intense prolifération des PCNE, et ces deux processus semblent être régulés par les mêmes voies signalétiques.

2. Les voies moléculaires impliquées dans la migration et prolifération des PCNEs

a- La voie RET

Parmi les nombreuses voies moléculaires caractérisées, la voie RET est sans doute la plus importante dans la migration des PCNEs. En effet, dans la majorité des cas de la maladie de Hirschsprung cette voie est altérée (Nagy & Goldstein, 2017). RET est un récepteur transmembranaire à tyrosine kinase exprimé par les PCNEs dès leur entrée dans le mésenchyme intestinal au début de leur migration (Goldstein et al., 2013). RET est activé par le facteur neurotrophique GDNF, exprimé dans le mésenchyme intestinal tout au long du tube digestif. Le GDNF se lie à RET et à son co-récepteur, GFR α 1. Cette liaison entraîne la phosphorylation de RET et l'activation de nombreuses voies, notamment les voies RAS/protéine kinase MAPK, les voies de la kinase N-terminale associée à Jun (JNK), et la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). La voie RET-GDNF permet non seulement le guidage des PCNEs mais aussi d'assurer leur survie et prolifération, et plus tard dans le développement, leur différenciation (Goldstein et al., 2013).

b- La voie de l'endothéline-3

Une autre voie de signalisation majeure dans le développement du SNE est l'endothéline-3 et de son récepteur couplé aux protéines G, l'EDNRB. L'EDNRB est exprimé par les PCNEs tandis que l'endothéline-3 est exprimée par le mésoderme intestinal. Le rôle principal de la signalisation EDNRB est d'inhiber la différenciation des PCNEs et de les maintenir dans un état prolifératif indispensable pour continuer la migration. En effet, une fois différenciés en neurones, ces cellules n'iront pas beaucoup plus loin (Nagy & Goldstein, 2017). Cette signalisation endothéline-3/EDNRB n'est pas

nécessaire avant que les PCNEs n'atteignent le cæcum ce qui explique pourquoi des atteintes de cette voie conduit spécifiquement à une aganglionose colorectale (Hosoda et al., 1994).

c- La voie des sémaphorines

Une autre voie de signalisation dans la mise en place du SNE, moins décrite dans la littérature, est celle des molécules sémaphorines (Sema). Les Sema sont une famille de glycoprotéines membranaires et/ou sécrétés, décrites dans la mise en place des systèmes nerveux centraux et périphériques (Pasterkamp, 2012) et majoritairement impliquées dans le guidage axonal en agissant sur la croissance des axones, leurs ramifications, et leurs orientations dans des directions précises (Fiore & Püschel, 2003). Elles sont aussi impliquées dans d'autres processus cellulaires relatifs au développement comme la division cellulaire, la différenciation et la survie cellulaire (Jongbloets & Pasterkamp, 2014).

Les Sema sont relativement bien conservées phylogénétiquement. On retrouve ainsi, chez les vertébrés, 5 familles allant de Sema3 à Sema7 (Mizuno et al., 2023). Ses récepteurs principaux sont les Plexines, des protéines transmembranaires, elles aussi divisées en 4 classes (Plexines A à D). Neuf Plexines ont été identifiées : Plexin A1-A4, B1-B3, C1 et D1 (Jongbloets & Pasterkamp, 2014). D'autres co-récepteurs pouvant agir comme récepteur principal existent. Ce sont les récepteurs Neuropiline-1 et Neuropiline-2 (récepteurs privilégiés de la Sema3). Lorsqu'ils agissent comme co-récepteurs, un récepteur Neuropiline s'associe à une Plexine, qui contient un domaine de signalisation, pour former un complexe récepteur hétérodimère (Tran et al., 2007).

Lors du développement du SNE, certaines études suggèrent que la colonisation du tube digestif par les cellules des crêtes neurales sacrées pourrait être inhibée par l'expression temporellement régulée de molécules répulsives dans l'intestin postérieur, telles que les Sema (Sasselli et al., 2012). Chez le poulet, Sema3A est exprimée de manière transitoire dans l'intestin postérieur et agit comme un chémorépulsif pour les axones des neurones (Shepherd & Raper, 1999). Lorsque l'expression de Sema3A diminue au cours du développement, les axones pénètrent dans l'intestin postérieur et les progéniteurs d'origine sacrées migrent avec eux. Par conséquent, la présence de Sema3A pourrait expliquer l'entrée retardée des PCNEs d'origine sacrée dans l'intestin (Sasselli et al., 2012). Chez la souris, Sema3A est également exprimée dans les régions les plus caudales de l'intestin et son absence provoque la migration prématurée de certains PCNEs sacrés dans la partie distale de l'intestin postérieur (Anderson et al., 2007). Sema3A a également été identifiée comme un régulateur important de la connectivité neuronale du SNE en période post-natale, comme nous le verrons plus en détail par la suite (Gonzales et al., 2020).

d- Autres voies

Il existe encore de nombreuses voies signalétiques, ainsi que des facteurs de transcription importants tels que SOX10 et PHOX2B exprimés par les PCNEs dès le début de leur migration et impliqués dans leur survie et prolifération. Il est important de mentionner que certaines protéines de la matrice extracellulaires comme la laminine, le collagène et des protéoglycans peuvent également influencer la migration des progéniteurs (Nagy & Goldstein, 2017).

3. Différenciation

La différenciation des PCNEs commence en amont du tube digestif alors même que le front de migration des progéniteurs en aval n'a pas fini de proliférer et de coloniser la paroi intestinale. Les PCNEs, qui expriment tous initialement RET et SOX10, vont se différencier en neurones entériques (maintenant l'expression de RET) ou en CGE (maintenant l'expression de SOX10) (Nagy & Goldstein, 2017). Les premières identités neurochimiques des neurones entériques apparaissent dès E8 dans le plexus myentérique, et de manière séquentielle. Ainsi, l'apparition des neurones sérotoninergiques dès E8, est suivie par celle des neurones cholinergiques (à E8 également) et peptidergiques (comprenant VIP, enképhaline, neuropeptide Y) à partir de E10 (Pham et al., 1991). De façon logique, les neurones du plexus sous-muqueux, en place après le plexus myentérique acquièrent leur nature neurochimique plus tardivement, allant de E8 à 7 jours post-natal (P7) pour les neurones cholinergiques et de E14 jusqu'à P7-P14 pour les neurones peptidergiques (Pham et al., 1991). La différenciation morphologique commence aussi avec des neurones de type Dogiel II observables à la naissance chez la souris (Foong et al., 2012). Les neurones nouvellement différenciés se polarisent rapidement par l'élongation d'un axone en direction caudale suivant l'axe de migration des PCNEs (Fig.9) (Young, 2008).

Cependant, à la naissance, le SNE reste immature et la maturation des neurones continuera après la naissance (Hao & Young, 2009).

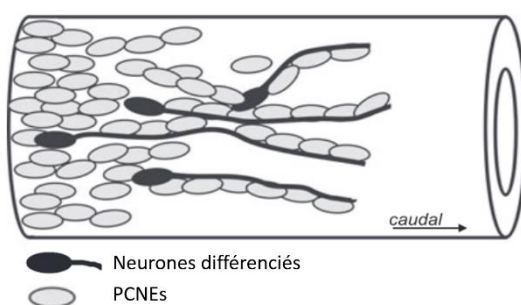


Figure 9 : Schéma illustrant la polarisation des neurones fraîchement différenciés, projetant leur axone dans le sens de la migration, en étroite association avec les PCNEs toujours en migration. (Young, 2008)

4. Maturation post-natale

a- Mise en place structurelle

Comme expliqué précédemment, ce sont les neurones du plexus myentérique qui mûrissent et s'organisent en premier, suivi par ceux du plexus sous-muqueux. A la naissance, les neurones sont organisés de manière diffuse, puis se regroupent en ganglion, au cours des 15 premiers jours après la naissance chez la souris. Cette étape de gangliogénèse aboutit à la formation d'un réseau de ganglions, contenant chacun une dizaine de neurones entériques, qui sont reliés entre eux par des fibres interganglionnaires (Faure et al., 2007). Dans ces ganglions contenant également des CGE, les neurones, qui arborent très tôt des prolongements, étendent des neurites qui s'entrecroisent initialement avant d'innover leurs cibles. Les mécanismes moléculaires contrôlant la morphogénèse des progéniteurs neuronaux en réseaux ganglionnaires organisés sont encore mal connus (Lake & Heuckeroth, 2013).

b- Mise en place fonctionnelle

Au cours de la maturation post-natale, les phénotypes neurochimiques continuent de se mettre progressivement en place. On observe notamment une augmentation de la proportion de neurones nitrergiques entre P1 et P5, qui se stabilise ensuite. De même pour les neurones cholinergiques, leur proportion augmente à partir de P14 (de Vries et al., 2010). Cette augmentation coïncide avec les premières contractions propulsives correctement rythmées du tube digestif qui apparaissent également à P14 (de Vries et al., 2010). Le SNE reste malléable et plastique tout au long de la vie. Il est capable de s'adapter à une blessure pour maintenir son intégrité (Galligan et al., 1989) ou encore d'amorcer des modifications neurochimiques ou phénotypiques en réponse à un changement de régime alimentaire (Stenkamp-Strahm et al., 2015 ; Reichardt et al., 2017).

Une dernière maturation a lieu majoritairement durant la phase post-natale, c'est la maturation synaptique nécessaire au bon fonctionnement du SNE et des fonctions digestives.

V. La synapse du SNE

Une synapse est une connexion fonctionnelle entre deux neurones, permettant la transmission d'informations sous forme de signaux électriques ou chimiques avec des cellules cibles. Dans le SNE, les synapses entériques sont des synapses chimiques récapitulant les mêmes caractéristiques structurales et fonctionnelles que les synapses chimiques du SNC (Wood & Kirchgeßner, 2004).

1. Maturation du réseau synaptique

La maturation du réseau synaptique est un phénomène largement post-natal. Néanmoins, les premiers marqueurs de l'établissement d'un réseau fonctionnel se mettent en place au stade embryonnaire. Dès E11,5 et 12,5, certains progéniteurs neuronaux expriment déjà des canaux sodiques voltage-dépendants et présentent une réponse calcique à une dépolarisation (Hao et al., 2013). En même temps, les premières expressions de plusieurs protéines associées aux synapses sont détectées. Ainsi, la protéine pré-synaptique, synaptophysine (une protéine majeure des vésicules synaptiques) est observable par immunomarquage dans des renflements neuritiques dès E11,5 (Hao et al., 2011). On retrouve également l'expression de la synaptotagmine 1 et la SNAP25 (*synaptosome – associated protein of 25 000 daltons*) entre E14, 5 et 15,5 dans l'intestin (Hao & Young, 2009).

Vers E16.5, des synapses plus matures sont observées sur les corps cellulaires neuronaux avec la présence d'éléments pré-synaptiques contenant de nombreuses vésicules, à la fois de petites vésicules claires et de grandes vésicules granulaires, regroupées au niveau de la membrane pré-synaptique (Vannucchi & Fausone-Pellegrini, 2000). Vers E18.5, la plupart des contacts entre les axones et les corps cellulaires du plexus myentérique présentent les caractéristiques des synapses matures du SNE (cf. partie V.2) (Vannucchi & Fausone-Pellegrini, 2000). Ainsi, les substrats anatomiques pour la transmission synaptique entre les neurones myentériques sont en place bien avant la naissance chez la souris et à P0 une activité synaptique est enregistrable dans la plupart des neurones entériques (Hao et al., 2013). Néanmoins, la maturation et le raffinement de ces précurseurs synaptiques, dont les mécanismes restent largement inconnus, s'opèrent durant la période postnatale jusqu'à l'adolescence, en même temps que les neurones entériques finissent leur maturation et structuration au sein des plexus. Ces étapes de maturation pourraient alors être particulièrement sensibles à l'environnement extérieur comme l'alimentation ou le microbiote intestinal (Parathan et al., 2020).

2. La synapse mature du SNE

a- Caractéristiques des synapses entériques

La caractérisation des connexions synaptiques du SNE a été amorcée dès les années 1970 (Baumgarten et al., 1970 ; Gabella, 1972). Un neurone entérique pré-synaptique peut établir un contact avec sa (ou ses) cible(s) de deux manières : par la terminaison synaptique et/ou par des varicosités synaptiques localisées tout au long de l'axone (Fig. 10A). Ces varicosités sont des renflements arborant des spécialisations pré-synaptiques similaires à celles observées au niveau des synapses chimiques dans le SNC (Gabella, 1972 ; Llewellyn-Smith et al., 1985). Des varicosités issues d'une même fibre nerveuse peuvent établir plusieurs contacts, souvent à quelques micromètres de distance, sur un même neurone post-synaptique (Young & Furness, 1995). A l'heure actuelle, il est encore très difficile de mettre en évidence des associations entre la structure, la nature neurochimique et la fonction de la synapse dans le SNE comme cela a pu être fait dans le SNC.

Pour le contrôle des fonctions motrices des muscles lisses intestinaux, il n'existe pas de jonction neuromusculaire aussi structurée que pour le contrôle des muscles striés par les neurones du SNC. En effet, Gabella, en 1972, décrivait une zone de contact plutôt lâche entre neurone entérique et la cellule musculaire lisse, cette dernière exprimant des récepteurs aux neurotransmetteurs (Gabella, 1972). On sait maintenant que ces connexions synaptiques sont beaucoup plus structurées avec des connexions très proches, se faisant via les varicosités des cellules musculaires, sur les CIC (Ward & Sanders, 2001). Les CIC ayant cette particularité d'établir des connexions électriques via des *gap junctions* avec les cellules musculaires, Ward et Sanders proposent de considérer le complexe neurone moteur-CIC-muscle, comme la jonction neuromusculaire du SNE (Fig. 10B) (Ward & Sanders, 2001).

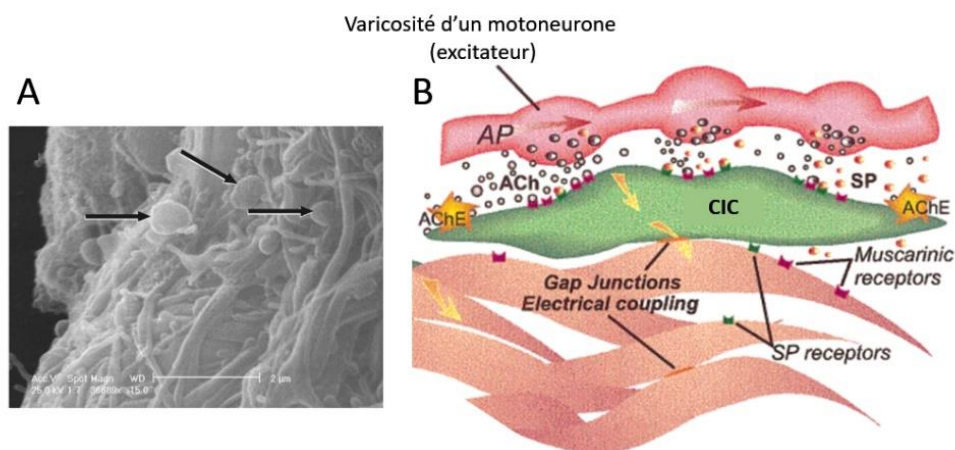


Figure 10 : (A) : Observation au microscope électronique des varicosités synaptiques (flèches noires) sur le réseau axonal de neurones entériques de rat (Böttner et al., 2015). (B) Jonction neuromusculaire du tube digestif. La proximité étroite entre varicosités synaptiques et les CIC facilite une diffusion rapide des neurotransmetteurs vers les récepteurs exprimés par les CIC. Les CIC sont couplés électriquement au muscle lisse via des gap junctions, permettant une transmission rapide du signal électrique au muscle lisse. AP = Potentiel d'action, CIC = cellules interstitielles de Cajal, SP = Substance P. Adapté de (Ward & Sanders, 2001)

Les synapses entériques contiennent une grande diversité de vésicules synaptiques (Gabella, 1972). L'utilisation du colorant styryl FM1-43 permettant d'observer la dynamique des vésicules synaptiques en temps réel, sur des neurones myentériques en culture ou préparés *ex vivo* à partir d'intestin de cochon d'inde, a montré que les varicosités entériques recyclent les vésicules synaptiques avec des cinétiques similaires à celles du SNC (Vanden Berghe & Klingauf, 2007). De plus, les varicosités marquées par le FM1-43 coexpriment des protéines pré-synaptiques telles que la synaptophysine (Vanden Berghe & Klingauf, 2007), appuyant le rôle de ces protéines pré-synaptiques dans la transmission synaptique entérique.

b- Marqueurs moléculaires des synapses entériques

Si les marqueurs moléculaires de la synapse neuro-neuronale centrale sont bien connus, la synapse entérique elle, ne peut pas prétendre à un aussi grand éventail de molécules caractérisées. On retrouve cependant dans le SNE, de nombreuses protéines communes au SNC, notamment en pré-synaptique où la machinerie entourant les vésicules synaptiques semble être la même.

Marqueurs pré-synaptiques : Les protéines associées aux vésicules synaptiques comme la Synapsin 1, la synaptophysin, la synaptobrevin et la SNAP-25, ont été mises en évidence dans les terminaisons pré-synaptiques du SNE (Böttner et al., 2013 ; Barrenschee et al., 2015 ; Hao et al., 2011 ; Hao & Young, 2009).

Marqueurs post-synaptiques : On a relativement peu d'information sur l'identité et la distribution des protéines post-synaptiques au sein du SNE. Quelques études ont mis en évidence l'expression de protéines post-synaptiques du SNC dans le SNE comme la PSD93, PSD95 et la neuroligin-1 (Brenman et al., 1996 ; Chaudhury et al., 2009 ; Zheng et al., 2017) mais leur distribution au sein du SNE n'a jamais été caractérisée.

3. La plasticité synaptique du SNE

a- La plasticité, présentation générale

Une des capacités les plus fascinantes (à mon humble avis) du système nerveux est sa capacité à s'adapter transitoirement ou durablement, tant sur le plan physique que fonctionnel, aux stimuli d'un monde extérieur dynamique. Appelée plasticité, cette capacité fondamentale est retrouvée chez des espèces allant de la mouche à l'humain. A l'échelle de la synapse, cette plasticité est appelée plasticité synaptique et représente la modulation fonctionnelle ou morphologique de la connexion entre les neurones. Ces modifications adaptatives constituent la base biologique de la mémoire et de l'apprentissage mais sont aussi indispensables au bon fonctionnement global du système nerveux. Les

deux grands phénomènes principaux derrière la plasticité synaptique sont la LTP et la LTD. La LTP (pour *Long Term Potentiation*) désigne le renforcement, en termes physiques et en termes de propagation de signal, d'une synapse en réponse à une stimulation répétée (stimulation à haute fréquence). La LTD (pour *Long term depression*) désigne quant à elle l'affaiblissement, physique ou fonctionnelle d'une synapse en réponse à une stimulation de basse fréquence (Glinert et al., 2022). Cette plasticité synaptique est résumée en une célèbre phrase de Hebb « *Neurons that fire together, wire together* » (Hebb, 1949).

b- La plasticité synaptique fonctionnelle

Les preuves de l'existence d'une LTP ou LTD *stricto-sensu* dans le SNE comme montrées dans le SNC semblent trop faibles pour appliquer ces termes aux neurones entériques. Néanmoins, des mécanismes similaires à ces formes de plasticité synaptique ont été observés dans le SNE. En effet, l'équipe de Furness a mis en évidence une hyperexcitabilité des neurones AH du plexus myentérique de cochon d'Inde après une stimulation répétée des fibres interganglionnaires pendant 4 à 30 min. Cette hyperexcitabilité est caractérisée par une excitation post-synaptique soutenue et lente (*sustained slow postsynaptic excitation*) pendant 3,5 heures post stimulation (Clerc et al., 1999). Chez les neurones de type S, une stimulation répétée déclenchait un potentiel post-synaptique exciteur rapide (fast EPSP), ayant aussi pour conséquence une hyperexcitabilité du neurone entérique (Clerc et al., 1999).

La médiation de cette plasticité synaptique se fait notamment par les neurotransmetteurs comme l'ACh et la sérotonine mais aussi, de façon moins attendue, par des facteurs immunitaires (Glinert et al., 2022). En effet, un exemple bien décrit de la plasticité synaptique du SNE est l'hyperexcitabilité des neurones entérique dans le contexte inflammatoire, mis en évidence sur des modèles de colites induite au TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) (Mawe et al., 2009).

Il est aussi à noter que la présence de protéines impliquées dans la plasticité synaptique du SNC a été mise en évidence dans le SNE, comme MeCP2 (Wahba et al., 2016), la reeline et son récepteur Dab1 (Böttner et al., 2014).

Dans leur très jolie revue sur la plasticité du SNE, Schemann, Frieling et Enck soulignent la difficulté de mesurer et d'observer la plasticité synaptique dans le SNE de la même manière que dans le SNC. En effet, dans le SNC, les neurones sont intégrés dans des réseaux précis et localisés alors que les réseaux neuronaux entériques sont très vastes et hétérogènes, avec différents types de neurones regroupés dans un ganglion. On ne sait alors pas comment stimuler une voie précise et la stimulation des fibres interganglionnaires active aussi bien des neurones inhibiteurs qu'excitateurs, rendant les mécanismes de LTP ou LTD difficilement caractérisables. Cela amène à repenser les protocoles de stimulation et de les adapter au SNE pour vraiment élucider ces mécanismes de plasticité des neurones entériques (Schemann et al., 2020).

c- La synaptogénèse

En principe, la synaptogénèse a lieu dans le SNE puisque des changements structurels synaptiques comme la modification de l'arborisation axonale ont été observés dans le SNE. Cependant, cette synaptogénèse n'a jamais été étudiée à la lumière d'un apprentissage ou comme conséquence de stimulation électrique dans le SNE comme cela a pu être fait dans le SNC (Schemann et al., 2020).

d- La plasticité synaptique dans un contexte pathologique

Evidemment, la plasticité synaptique du SNE peut avoir des conséquences maladaptives et contribuer à la physiopathologie de certains troubles gastro-intestinaux (Mawe & Sharkley, 2023). L'implication de la plasticité synaptique du SNE a été mise en évidence dans des cas d'hypersensibilité colique (Zhang et al., 2018 ; Zhang et al., 2022) et dans le cadre de pathologie chronique de l'intestin comme l'IBS (Syndrome de l'intestin irritable). De façon intéressante, l'implication de MeCP2 dans la plasticité synaptique des neurones entériques est à mettre en relation avec des mutations de MeCP2 décrite dans le syndrome de Rett, un trouble développemental sévère fréquemment associé à des troubles gastro-intestinaux (Wahba et al., 2016). Il apparaît alors crucial de considérer le rôle de la plasticité synaptique du SNE dans les troubles gastro-intestinaux et notamment dans la persistance de ces derniers, comme dans le cadre de stress inflammatoire pouvant développer des altérations de la motricité, persistantes jusqu'à 4 semaines après la fin de l'inflammation (Mawe, 2015).

Cette plasticité rend le SNE d'autant plus sensible au milieu extérieur et notamment au microbiote intestinal qui pourrait contribuer au modelage du SNE dans le contexte physiologique comme physiopathologique. Ce dernier élément sera plus abondamment discuté dans le chapitre 3 portant sur le microbiote intestinal.

VI. L'intime relation du SNE avec le SNC

Cette dernière partie a été déjà bien amorcée au cours de ce premier chapitre. En effet, le SNE est indéniablement en étroite relation avec le SNC. L'idée que le cerveau et le système digestif sont liés n'est pas récente. Déjà en 1840, le médecin américain William Beaumont démontra expérimentalement que la digestion pouvait être impactée par l'état émotionnel. Pour l'anecdote, qui me semble assez atypique pour la raconter ici, W. Beaumont fit cette expérience sur Alexis St. Martin, un jeune canadien dont l'estomac avait été perforé par un tir de mousquet et qui, soigné par Beaumont, avait survécu. Le trou dans son estomac ne s'étant jamais refermé correctement, Beaumont saisit cette opportunité pour faire avancer la gastroentérologie en insérant des morceaux de nourriture dans l'estomac de St. Martin et en mesurant la digestion sous différents paramètres

(Gale, 2021). Cela amena à 238 expériences sur 10 ans (St. Martin mourant paisiblement à 86 ans, comme quoi, avoir un estomac étanche, c'est surcoté) dont une série d'expériences durant lesquelles Beaumont remarqua que la stimulation émotionnelle de son « patient-cobaye » (peur et colère) ralentissait la digestion et la vidange gastrique (Mai, 1988).

Aujourd'hui l'axe intestin cerveau est bien établi et se définit comme une voie de signalisation hormonale et neuronale, bidirectionnelle reliant ces deux organes (Wachsmuth et al., 2022). Vient s'ajouter à cet axe un autre acteur extrêmement important, le microbiote intestinal.

1. La part prépondérante du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal regroupe l'ensemble des microorganismes qui peuple l'intérieur du tractus digestif (Le Dréan et al., 2021). Majoritairement composé de bactéries, archées et virus, il est en contact direct avec le système digestif et donc proche physiquement du SNE. Il est une source immense de composés métaboliques et autres dérivés microbiens. Nous commençons à peine à comprendre l'étendue de son influence sur l'axe intestin-cerveau et sur notre homéostasie en général. Son impact sur cet axe sera amplement décrit dans le chapitre 3 qui lui est consacré. Brièvement cependant, le microbiote intestinal communique et influence le SNE et le SNC via les voies neuronales, humorales mais aussi immunitaires, notamment au travers des nombreux composés actifs qu'il produit (Margolis et al., 2021). Le microbiote intestinal peut aussi être modulé par l'activité du SNC et du SNE justifiant sa pleine position dans ce qu'on définit maintenant comme l'axe microbiote-intestin-cerveau (MIC).

2. Connexions SNE-SNC par les voies humorales

La communication entre l'intestin et le cerveau est régulée par divers peptides ou hormones sécrétés par l'intestin en réponse aux nutriments. Ces molécules de signalisation peuvent entrer dans la circulation et agir directement sur le cerveau ou indirectement par une action paracrine sur les neurones afférents vagues et spinaux locaux qui innervent l'intestin. Un bon exemple de cette communication intestin-cerveau réside dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Classiquement et en condition physiologique, les cellules entéroendocrines sensibles au contenu luminal libèrent une grande variété de peptides en fonction de la prise alimentaire (GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*), cholecystokinine (CCK)) ou en fonction de la faim (somatostatine, ghrelina) (Gribble & Reimann, 2016) qui passent dans la circulation sanguine et agissent sur les centres de régulation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et de l'homéostasie énergétique dans le cerveau (hypothalamus majoritairement) (Wachsmuth et al., 2022).

Les neurotransmetteurs libérés par le cerveau, le SNE et les cellules entéroendocrines sont aussi très importants dans la communication humorale entre SNE et SNC. On y retrouve notamment la 5-HT, libérée par le SNC, le SNE et les cellules entérochromaffines de la BEI (Mittal et al., 2017). La 5-HT est impliquée dans de nombreuses fonctions du SNC, comme la régulation des émotions, de l'appétit, de la réponse au stress, et au niveau du SNE, dans les fonctions digestives (secrétions, péristaltisme) (O'Mahony et al., 2015). Des modifications dans la voie de la 5-HT ont été mises en évidence dans des altération de l'axe microbiote-intestin-cerveau (Margolis et al., 2021).

3. Connexions SNE-SNC par les voies nerveuses

Nous avons déjà abordé au cours de ce manuscrit les nombreux liens nerveux entre le SNE et le SNC. Le SNC innerve le système digestif. Cette innervation extrinsèque vagale, spinale thoracolumbaire et spinale lombo-sacrée, peut-être sensorielle (afférente) et motrice (efférente). Le nerf vague, composé à 80 % de fibres afférentes et de 20 % de fibres efférentes constitue le principal moyen d'échange d'informations entre le SNE et le SNC (Bonaz et al., 2018).

Innervation efférente : Elle concerne les neurones pré-entériques projetant dans les plexus entériques et modulant l'activité des neurones entériques (Furness, 2014). Quelques fonctions motrices spécifiques du tractus digestif sont directement contrôlées par le SNC comme le contrôle du muscle strié de l'œsophage (innervation vagale), la défécation, et la vasoconstriction/dilatation des vaisseaux sanguins (innervation sympathique) (Furness, 2014).

Innervation afférente : Elle implique des terminaisons laminaires intraganglionnaires, des réseaux intramusculaires et des terminaisons nerveuses de la muqueuse (Brookes et al., 2013). Les terminaisons laminaires intraganglionnaires sont des terminaisons nerveuses ramifiées qui s'étendent dans le plexus myentérique. Ce sont des mécanorécepteurs sensibles à l'étirement et à la déformation de la paroi digestive (Brookes et al., 2013 ; Zagorodnyuk et al., 2001). Les réseaux intramusculaires sont constitués par des axones afférents unitaires projetant dans la couche musculaire du muscle circulaire lisse, parallèles aux fibres musculaires et formant des synapses avec les CIC. Ce complexe ainsi formé pourrait servir d'informateur au SNC de l'état d'étirement du muscle (Powley & Phillips, 2011). Enfin, les terminaisons de la muqueuse innervent la muqueuse de l'estomac, les villosités de l'intestin grêle et les cryptes intestinales (Powley et al., 2011). Ces terminaisons sont sensibles à la déformation physique mais aussi à des stimuli chimiques comme l'acidité du lumen. Leur sensibilité peut être modulée par des hormones comme la leptine ou la ghréline (Furness, 2014).

La connexion la plus directe réside dans la présence des neurones entériques intestinofuges abordés précédemment. Ces neurones projettent directement dans le SNC (moelle épinière et les noyaux dorsaux du nerf vague dans le tronc cérébral) (Furness, 2006) via la voie sacrée ou vagale, ainsi que vers les ganglions sympathiques. De plus, toutes les afférences du SNC dans l'intestin mentionnées précédemment, constituent indirectement une voie de communication du SNE vers le SNC.

4. Implication dans les maladies du cerveau

La pleine réalisation de l'existence de cet axe microbiote-intestin-cerveau a changé le paradigme pour les maladies du cerveau, avec alors tout une dimension intestinale et microbienne qui s'ouvre à la recherche. De la même manière, une dimension psychiatrique s'ajoute à de nombreuses maladies intestinales comme dans le cas de l'IBS, pathologie caractérisée par des douleurs abdominales et des troubles du transit qui s'accompagnent effectivement de comorbidités psychiatriques comme la dépression et l'anxiété (Margolis et al., 2021).

Concernant les maladies du cerveau, on observe des désordres de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer) (Scheperjans et al., 2015 ; Chen et al., 2022) et dans les maladies neurodéveloppementales comme la schizophrénie et surtout dans les troubles du spectre de l'autisme (TSA) (Shen et al., 2018 ; Cryan et al., 2020 ; Sharon et al., 2019).

Chapitre 2 : Les troubles du spectre de l'autisme

« Je me représentais l'amitié comme un papillon, à la fois beau et fragile, qui s'envolait dans les airs et que toute tentative d'attraper revenait à détruire. »

Daniel Tammet dans « Je suis né un jour bleu »

I. Présentation générale

1. Historique

Le terme « autisme » vient de la contraction du mot grec « auto » (le soi) et le suffixe anglais « ism ». Il a été inventé par le psychiatre suisse Eugen Bleuler en 1911 pour décrire une forme de schizophrénie (mot qu'il a aussi inventé) dans laquelle les individus se coupent du monde extérieur pour vivre dans un monde intérieur « *Loss of contact with reality together with the relative and absolute predominance of the inner life* » (Bleuler, 1911 – traduit en anglais en 1950).

Plus tard, en 1943, le pédopsychiatre Léo Kanner reprend ce terme pour décrire les comportements de 11 enfants présentant des « troubles autistiques des contacts affectifs » caractérisés par une « incapacité innée à former des contacts avec les autres » (Kanner, 1943). La description plus détaillée qui en est faite rapporte l'absence d'utilisation communicative du langage, la préservation de la similitude (« *preservation of sameness* »), des intérêts et activités restreints, et des schémas de comportement stéréotypés et répétitifs, tels que le battement des mains et la rotation (Harris, 2018). Initialement classifié comme une forme de schizophrénie infantile par la deuxième édition du Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-II) (« *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* ») (APA, 1968), il faudra attendre 1980 et la troisième édition du DSM pour voir l'autisme séparé de la schizophrénie et considéré comme un trouble à part entière (DSM-III APA, 1980). Appelé alors « autisme infantile précoce », l'autisme est défini par une apparition avant l'âge de 30 mois de symptômes caractéristiques comme un manque généralisé de réactivité envers les autres, un développement linguistique atypique, des réponses inhabituelles à l'environnement, et l'absence d'hallucinations et de délires tels qu'observés dans la schizophrénie (APA, 1980 ; Harris, 2018). En 1987, la révision du DSM-III regroupe ces critères sous le nom de «

troubles autistiques » (APA, 1987). En 1994, le DSM-IV intègre les troubles autistiques comme un sous-groupe des troubles envahissants du développement, aux côtés du syndrome de Rett, du trouble désintégratif de l'enfance (syndrome d'Heller) et du syndrome d'Asperger (APA, 1994 ; Volkmar & McPartland, 2014).

Le terme « syndrome d'Asperger » a été introduit pour la première fois en 1981 par la psychiatre Lorna Wing reprenant les travaux du psychiatre allemand Hans Asperger (Wing, 1981). Contemporain de Kanner, H. Asperger décrivait en 1944 les comportements de quatre jeunes garçons présentant de sévères déficits sociaux liés à une incapacité à comprendre les règles gouvernant les comportements sociaux, une insensibilité à la communication non-verbale et des intérêts restreints (Asperger cite en exemple les trains à vapeur, la généalogie royale, les « monstres » préhistoriques). Ces enfants présentaient aussi des troubles de la motricité (mouvements maladroits, trop ou pas assez intenses, mal adaptés à la situation) mais ne présentaient pas de déficit intellectuel et possédaient de très bonnes capacités langagières (Asperger, 1944 ; Wing, 1981).

En 2013, le DSM-V élimine les quatre sous-groupes des troubles envahissants du développement et introduit le terme, **troubles du spectre de l'autisme** (TSA). Le syndrome de Rett, représentant une pathologie génétique avec un retard intellectuel profond, et le trouble désintégratif de l'enfance représentant une dégénération cognitive continue, sont exclus des TSA. Le syndrome d'Asperger est intégré au sein du spectre et ne constitue plus un diagnostic à part entière (APA, 2013 ; Volkmar & McPartland, 2014).

2. Diagnostic

Aujourd'hui, les TSA représentent un terme « parapluie » regroupant un ensemble de troubles neurodéveloppementaux dont le diagnostic se fait suivant les cinq critères du DSM-V (APA, 2013).

Critère A : Déficiences persistantes en communication sociale et en interaction sociale dans divers contextes, non expliqués par des retards de développement généraux. Le critère A doit se manifester par les 3 symptômes qu'il regroupe : **A1** : problèmes dans l'initiation et la réponse sociale (ex : toucher les autres de façon inappropriée, initier une interaction uniquement si besoin d'aide etc.). **A2** : problèmes liés à la communication non verbale (ex : mauvais contact visuel, tourner le dos à la personne tout en parlant). **A3** : problèmes liés à la conscience sociale et à la compréhension, ainsi qu'au concept plus large de la relation sociale (ex : absence d'intérêt pour les autres, difficultés à participer à des jeux imaginatifs avec les autres).

Critère B : Comportement, intérêts ou activités restreints et répétitifs, se manifestant par au moins 2 des 4 symptômes qu'il regroupe. **B1** comprend un discours, des mouvements et des jeux atypiques (ex : écholalie, mouvement de main répétitifs). **B2** comprend des rituels et une résistance au changement (ex : routines précises, pensées rigides). **B3** comprend des préoccupations concernant des objets ou des sujets (ex : obsession de certains chiffres, attachement à des objets inhabituels comme

un bout de plastique ou de ficelle). **B4** comprend une hyper- ou hypo-réactivité aux stimuli sensoriels ou intérêt inhabituel pour les aspects sensoriels de l'environnement (ex : indifférence apparente à la douleur/à la chaleur/au froid, fascination pour les objets qui tournent).

Critère C : Les symptômes doivent être présents dans la petite enfance (mais peuvent ne pas devenir entièrement manifestes tant que les exigences sociales ne dépassent pas les capacités limitées).

Critère D : Les symptômes limitent et entravent le fonctionnement quotidien.

Critère E : Ces perturbations ne s'expliquent pas par une déficience intellectuelle ou un retard global du développement. À noter que l'autisme est une comorbidité fréquente de la déficience intellectuelle (et inversement). Pour discriminer l'autisme de la déficience intellectuelle, la communication sociale doit être inférieure à ce qui est attendu pour le niveau de développement général. De la même manière, le DSM-V reconnaît explicitement que l'autisme peut être associé à des maladies génétiques comme le syndrome de l'X fragile et le syndrome de Rett (Lord et al., 2018 ; APA, 2013).

À ces cinq critères s'ajoutent 3 niveaux de sévérité des symptômes allant du niveau 1 (nécessitant un soutien) au niveau 3 (nécessitant un soutien très substantiel), en fonction des déficits sociaux et des comportements répétitifs et restreints de l'individu. Ces niveaux permettent une certaine flexibilité et individualisation dans le diagnostic et la planification du traitement.

3. Outils d'évaluation des TSA

Pour évaluer la sévérité des symptômes, de nombreuses échelles existent dont les plus couramment utilisées et retrouvées dans la littérature scientifique sont l'ADOS, l'ADI-R, le CARS, le SRS et enfin le Vineland.

a- L'ADOS :

L'*Autism Diagnostic Observation Schedule* (ADOS) ou dans sa version la plus récente ADOS-2 est un instrument diagnostique standardisé conçu pour évaluer la communication, l'interaction sociale, les compétences de jeu et les comportements restrictifs et répétitifs (Lord et al., 2000). Il est basé sur l'observation par le clinicien pendant 60 à 90 min de l'individu testé. L'ADOS est constitué de plusieurs modules adaptés à différents niveaux de langage et d'âge : **Module « toddler »** pour les très jeunes enfants âgés de 12 à 30 mois. **Module 1** : pour les enfants qui ne parlent pas ou qui ont un langage limité. **Module 2** : pour les enfants qui utilisent un langage phrastique, mais qui ont un discours limité. **Module 3** : pour les enfants et les adolescents verbaux qui sont d'âge scolaire. **Module 4** : pour les adolescents et les adultes verbaux. Chaque critère est évalué par le clinicien et noté de 0 (pas

d'atteintes comportementales) à 3 (preuve irréfutable d'une atteinte comportementale) (Lord et al., 2000 ; Syriopoulou-Delli & Folostina, 2022).

b- L'ADI-R :

L'ADI-R, ou *Autism Diagnostic Interview-Revised*, est un entretien clinique structuré destiné aux parents ou aux soignants de personnes soupçonnées de présenter des TSA. L'ADI-R est approprié pour les enfants dès 18 mois, jusqu'à l'âge adulte. Il est constitué de plusieurs items couvrant les trois symptômes principaux des TSA : la communication, l'interaction sociale et les comportements restreints et répétitifs. Chaque item de l'ADI-R est codé selon une échelle de 0 à 3 : 0 signifie que le comportement décrit par l'item n'est pas présent ou se trouve dans les limites normales pour l'âge ou le niveau de développement de l'individu. 1 signifie que le comportement est présent de manière légère ou atypique. 2 et 3 indiquent des niveaux croissants de gravité ou de fréquence du comportement (Le Couteur et al., 1989 ; Lord et al., 1994). Le score total, obtenu via l'algorithme de diagnostic de l'ADI-R, doit dépasser un certain seuil pour dénoter un trouble autistique chez l'individu testé.

c- Le CARS :

Le CARS, ou *Childhood Autism Rating Scale*, est un outil d'évaluation utilisé pour diagnostiquer et quantifier la sévérité des TSA chez les enfants. Le CARS et sa version actualisée CARS-2, est adapté pour les enfants de plus de 2 ans. Le CARS comprend 15 items, qui évaluent divers domaines associés au TSA (les relations avec les personnes, l'imitation, les réponses émotionnelles, l'utilisation des objets, l'adaptation au changement, les réponses visuelles, auditives et non verbales etc...) (Schopler et al., 1980). Chaque item est noté sur une échelle de 1 (normal pour l'âge correspondant) à 4 (anormalement sévère pour l'âge correspondant). Le score total varie de 15 à 60. Un score <30 indique une absence d'autisme, un score de 30 à 36,5 indique un autisme léger à modéré, et un score total de ≥37 indique un autisme sévère. Ces *cut-offs* peuvent légèrement varier en fonction de la forme de CARS utilisée (Rellini et al., 2004). Le CARS est particulièrement utile pour distinguer, rapidement, les enfants atteints d'autisme de ceux présentant un déficit cognitif (Ji et al., 2023).

d- Le SRS :

Le *Social Responsiveness Scale* (SRS) est un outil d'évaluation conçu pour être complété par des parents, des enseignants ou d'autres personnes proches de l'individu évalué. Le SRS est adapté aux individus âgés de 4 à 18 ans, mais des versions pour adultes existent. Le SRS est un questionnaire comportant 65 items couvrant 5 domaines clés liés aux compétences sociales : La conscience sociale, la cognition sociale, la communication réciproque, les comportements sociaux répétitifs et les comportements sociaux motivés. Chaque item est évalué sur une échelle de 1 (jamais vrai) à 4 (presque toujours vrai) en fonction du comportement (Constantino & Gruber, 2012). Le score final (T-score)

renseigne sur la sévérité des TSA. Un T-score > 76 indique des déficits sévères, un score entre 75 et 66 indique des atteintes modérées et un score entre 65 et 60, des atteintes légères. Un T-score de 59 et moins indique l'absence de difficultés sociales évocatrices d'un possible diagnostic TSA (Bruni, 2014).

e- Le Vineland :

Le ***Vineland Adaptive Behaviour Scales*** (souvent simplement appelé "Vineland") est un instrument utilisé pour évaluer les compétences adaptatives d'un individu. Ces compétences font référence à la capacité d'une personne à s'adapter et à fonctionner efficacement dans son environnement quotidien. Ce test se présente sous forme d'entretien semi-structuré mené avec un parent, un soignant ou un professionnel proche de l'individu évalué. Le Vineland dans sa version actualisée (Vineland III) évalue 4 domaines : la communication, la sociabilisation, l'autonomie quotidienne et la compétences motrices (fines et globales) (Sparrow et al., 2016).

Ainsi ces différents tests évaluent différents aspects des trouble TSA et sont complémentaires entre eux. Par exemple, l'ADI-R est couramment utilisé en conjonction avec l'ADOS pour fournir une évaluation globale des troubles TSA d'un individu et constituent des standards cliniques pour l'identification des enfants (ou adultes) atteints d'autisme (Mazefsky et al., 2013).

4. Prévalence des TSA

a- Prévalence dans le monde

La prévalence mondiale des TSA est en constante augmentation. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) rapporte que le comportement d'1 personne sur 100 est sur le spectre autistique (Zeidan et al., 2022). Ce chiffre était de 1 personne sur 160 en 2012 (Elsabbagh et al., 2012). En France, la Haute Autorité de santé (HAS) estime que les TSA concernent entre 0.9% et 1.2% des naissances. Ce chiffre est sensiblement le même pour le reste de l'Europe (Zeidan et al., 2022). Aux Etats-Unis, la prévalence est plus importante que la moyenne mondiale et est aussi en constante augmentation affectant 1 enfant sur 150 en 2000, puis 1/88 en 2008 et 1/69 en 2012. En 2023, les chiffres officiels du *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estiment qu'1 enfant âgé de moins de 8 ans sur 36 présente un TSA (Maenner et al., 2023). Ce chiffre atteint 1 enfant sur 22 (4.49 %) en Californie (CDC).

L'augmentation de la prévalence mondiale des TSA semble en grande partie expliquée par les changements dans les critères diagnostiques (DSM-V et introduction du « spectre autistique »), le développement d'outils diagnostiques standardisés et de plus en plus performants face à la diversité des TSA ainsi qu'une plus grande sensibilisation du public à l'autisme permettant une reconnaissance et une identification plus précoce des symptômes par les parents ou enseignants (Fombonne, 2023).

b- Point sur le diagnostic aux Etats-Unis

La prévalence particulièrement élevée de l'autisme aux États-Unis par rapport à l'Europe pourrait s'expliquer par une politique de dépistage précoce des TSA. En effet, les bénéfices d'un diagnostic et d'une prise en charge précoces des TSA sont soutenus par plusieurs études montrant des améliorations significatives des fonctions cognitives, linguistiques et socio-émotionnelles chez les enfants avec TSA (Vivanti et al., 2014, Hyman et al., 2020). Ainsi, la *American Academy of Pediatrics* préconise un dépistage systématique chez les jeunes enfants, à 18 et 24 mois (CDC) et dès 9 mois par le *National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities*. Ces dépistages utilisent des outils diagnostiques adaptés comme le *Modified Checklist for Autism in Toddlers (M-CHAT)* (Okoye et al., 2023 ; Fombonne, 2023).

Si le dépistage précoce montre en général une bonne stabilité, avec 95% de maintien du diagnostic TSA après 1 an (Pierce et al., 2019), d'autres études montrent une stabilité plus faible après une plus longue période post-diagnostic, avec entre 17-32 % des enfants qui ne remplissaient plus les critères TSA, 2 ans post-diagnostic (Sutera et al., 2007 ; Turner & Stone, 2007) et 37% 4 ans post-diagnostic (Harstad et al., 2023). Ces chiffres laissent apercevoir une possibilité de faux positifs sur le long terme avec des diagnostics qui changent avec le temps (s'améliorant ou évoluant vers d'autres diagnostics). Dans son éditorial, Fombonne alerte sur « l'industrialisation » du diagnostic, rappelant, comme Bishop et Lord avant lui, que le diagnostic TSA est un « processus » qui doit suivre l'enfant, rester flexible et ne doit pas être réduit à un score ADOS (Fombonne, 2023 ; Bishop & Lord, 2023).

Il est important de noter qu'aux États-Unis, un diagnostic d'autisme peut ouvrir la porte à des services spécialisés, des soutiens éducatifs et à d'autres ressources, incitant certains parents et éducateurs à rechercher activement un diagnostic TSA pour permettre une meilleure prise en charge des soins de l'enfant (Fombonne, 2023).

Enfin, la part des facteurs environnementaux dans l'augmentation de la prévalence mondiale et particulièrement aux USA n'est pas à exclure, même si la nature et l'importance de cette part restent encore méconnues (cf. partie sur l'étiologie des TSA).

c- Populations à risque de sous-diagnostic

Certaines populations sont à risque de sous-diagnostic de l'autisme, en particulier à cause de leur origine ethnique et de leur statut socio-économique. Les individus issus de ces milieux ont tendance à obtenir un diagnostic de TSA plus tardivement que ceux des populations blanches et économiquement privilégiées (Begeer et al., 2009 ; Lord et al., 2018). Toutefois, cet écart semble s'atténuer aux États-Unis, selon les dernières données du recensement du CDC de 2023, avec pour la première fois, plus d'enfants non-blancs diagnostiqués, inversant la tendance des différences de prévalence de l'autisme en fonction de la race et de l'ethnie observées par le passé (Maenner et al.,

2023). Les adultes non diagnostiqués durant leur enfance ainsi que les femmes présentent également un risque accru de sous-diagnostic (Lai, 2014; Lai & Baron-Cohen, 2015).

5. Le sexe ratio dans les TSA

a- Un sexe ratio différent en fonction de la sévérité de l'autisme

Il me semble important de décrire avec un peu plus de précision le sexe-ratio atypique de l'autisme et les différentes hypothèses actuelles pouvant expliquer une telle différence. En effet, dès les premières études, l'autisme est majoritairement décrit chez les garçons plus que chez les filles. Ce ratio, stabilisé à 4 ou 3 garçons pour 1 fille (Loomes et al., 2017), n'est cependant pas le même en fonction de la sévérité et des comorbidités associées. Le sexe-ratio diminue d'autant plus les symptômes autistiques sont sévères ou qu'ils sont accompagnés d'une déficience intellectuelle (alors, 2 garçons pour 1 fille) (Dworzynski et al., 2012 ; Zeidan et al., 2022). De la même manière, les garçons sont beaucoup plus diagnostiqués avec un autisme de haut niveau (à haut potentiel intellectuel) que les filles (ratio 6/1) (Fombonne, 2009). Ces différences pourraient s'expliquer notamment par 2 hypothèses. La première est sociétale : les femmes aux TSA « légers » et à haut potentiel passeraient plus facilement sous le radar grâce à de meilleures capacités de compensation et de camouflage aux yeux de la société que les garçons (Loomes et al., 2017). La deuxième hypothèse est biologique et suggère l'existence d'une protection féminine intrinsèque contre le développement des troubles autistiques, c'est la « *female umbrella theory* ».

b- *The female umbrella theory*

Cette théorie suggère que les femmes possèdent des mécanismes biologiques ou génétiques qui les protègent davantage contre l'autisme, et de manière plus générale, contre le développement de troubles neurodéveloppementaux qui affectent aussi plus les hommes que les femmes (Bölte et al., 2023). Si les mécanismes biologiques sous-jacents sont encore mal compris, cette théorie est appuyée par les récents apports de la génétique observant chez les femmes avec TSA, un nombre accru de mutations génétiques associées à l'autisme (***mutational load***), dont des mutations à plus fort taux de pénétration (Dougherty et al., 2022) que chez les hommes avec TSA (Jacquemont et al., 2014 ; Zhang et al., 2020, Satterstrom et al., 2020). Ainsi, les individus de sexe féminin pourraient nécessiter une plus grande accumulation de variations génétiques ou mutations associées à l'autisme pour manifester des TSA comparé aux individus de sexe masculin (Fig. 11).

Une autre théorie expliquant la « protection » féminine à l'autisme se base sur le deuxième chromosome X possédé par les femmes (Baron-Cohen et al., 2011). En effet, un très grand nombre de gènes exprimés dans le cerveau sont portés par le chromosome X (Nguyen & Distèche, 2006). Les hommes, ne possédant qu'une seule copie de ce chromosome, sont davantage à risque de développer un trouble neurodéveloppemental en cas de mutation génétique, comme c'est le cas pour le syndrome

de l'X fragile qui affecte majoritairement les hommes (Bailey et al., 2008). Cependant, malgré ces théories, il ne faut pas exclure la possibilité que les outils diagnostiques actuels soient défailant à détecter un autisme féminin, qui pourrait s'exprimer différemment de l'autisme masculin sur lequel les outils diagnostiques et le DSM-V ont traditionnellement été calibrés (Baron-Cohen et al., 2011).

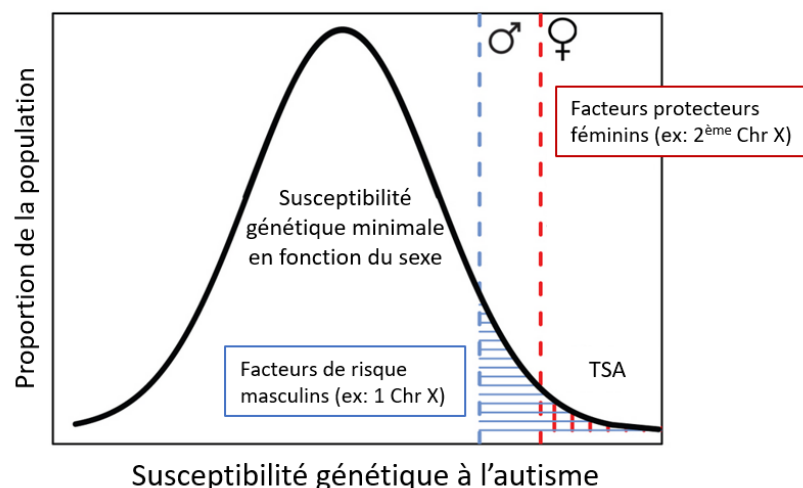


Figure 11 : Susceptibilité à l'autisme entre les femmes et les hommes. A : Courbe de la susceptibilité génétique à l'autisme dans une population. Les seuils de diagnostic sont représentés en bleu pour les hommes et en rouge pour les femmes. Le seuil féminin est décalé vers la droite. Une charge plus importante de facteurs de susceptibilité serait nécessaire pour déclencher l'autisme chez les individus féminins. Ce modèle pourrait expliquer le sexe ratio de 4 :1 (H/F) dans les TSA. Traduit de Dougherty et al., 2022.

II. Etiologie des TSA

L'étiologie de l'autisme est complexe. En effet, les TSA sont multifactoriels, influencés par une combinaison d'éléments génétiques, environnementaux et épigénétiques. En pratique, la grande majorité des cas d'autisme n'a pas de causes spécifiques identifiées (autisme dit idiopathique, estimé à 85% des cas d'autisme) (Casanova et al., 2020).

1. Causes génétiques

a- L'héritabilité des TSA

La part de la génétique dans l'autisme avait déjà été, sans le savoir, abordée par Léo Kanner lorsqu'il qualifiait « d'innés » les troubles autistiques chez ses enfants (Harris, 2018). La part exacte de

la génétique dans l'autisme est très difficile à déterminer. Cependant, l'étude génétique de cohortes d'autisme familial et de jumeaux mono- ou di-zygotes nous permettent d'estimer l'héritabilité de l'autisme entre 50 et 80% (Sandin et al., 2014, Bai et al., 2019). Autrement dit, 50 à 80% de la variabilité dans le risque de TSA peut être attribuée à des facteurs génétiques, faisant de l'autisme le trouble neurodéveloppemental avec l'héritabilité la plus haute (Genovese & Butler, 2023). Ainsi, un enfant né dans une famille ayant un aîné avec TSA, à 20% de risque en plus de développer un TSA par rapport à la population neurotypique (Ozonoff et al., 2011). Chez les jumeaux monozygotes et dizygotes, l'héritabilité est estimée, respectivement, à 90% et 53% (Tick et al., 2016) avec une part plus ou moins importante de l'environnement partagé (Hallmayer et al., 2001).

Malgré cette forte héritabilité, les anomalies génétiques responsables des TSA sont encore largement inconnues et très hétérogènes. La grande majorité des individus avec TSA ne sont pas rattachés à une mutation précise. On estime que 50% des facteurs de risque génétiques de l'autisme sont constitués de variants communément retrouvés dans la population dont les effets s'additionnent (modèle multi-hit) (Fig. 12) (Gaugler et al., 2014). Seulement 5 à 10% des facteurs de risques génétiques sont estimés découler de rares variants identifiés (Fig. 12) (Ramaswami & Geschwind, 2018). Parmi ces rares variants, on retrouve deux grands types d'anomalies génétiques, les anomalies de nombre de copies (CNVs pour « *Copy number variations* ») et les polymorphismes de nucléotides simples (SNPs, pour « *Single Nucleotide Polymorphisms* »). Ces variants peuvent être hérités des parents ou apparaître spontanément durant la méiose (*de novo*) (Choi & An, 2021).

b- Les CNVs

Les CNVs, sont des variations de la structure du génome qui engendrent des copies supplémentaires ou manquantes de segments d'ADN. Ces variations peuvent couvrir un ou plusieurs gènes et ainsi impacter leur fonctionnement (Thapar & Rutter, 2021). De nombreux CNVs sont associés à l'autisme. Cependant, la plupart de ces CNVs présentent des effets pléiotropes et sont liés à un profil clinique sévère. Dans ce profil, l'autisme n'est qu'une partie des symptômes observés (Thapar & Rutter, 2021).

Les CNVs associés à un risque accru de développer des TSA les plus connus affectent les régions chromosomiques 16p11.2, 15q11-q13, 1q21.1, et 22q11.2 (Sanders et al. 2015) (Fig.12). Les duplications et délétions de la région **16p11.2** sont les CNVs les plus couramment retrouvés dans les TSA et comptent pour respectivement 0.24% et 0.31% des cas d'autisme (Ramaswami & Geschwind, 2018), associés à des retards de développement, et des difficultés d'apprentissage (Fetit et al., 2020).

Les CNVs des régions **15q11-q13** représentent 0,41% des cas de TSA (Ramaswami & Geschwind, 2018) et sont associés aux syndromes de Prader-Willi, le syndrome d'Angelman ou le syndrome de la duplication 15q11-q13 (*15q11-q13 duplication syndrome*) entraînant notamment des retards développementaux et des troubles comportementaux (Kalsner & Chamberlain, 2015). Des CNVs dans la région **1q21.1** sont retrouvés chez environ 0,25% des cas d'autisme (Szatmari et al., 2007).

Enfin, la délétion de la région **22q11.2** est plus rare et associée au syndrome de DiGeorge dont 15-50% des patients présentent des TSA (Ousley et al., 2017).

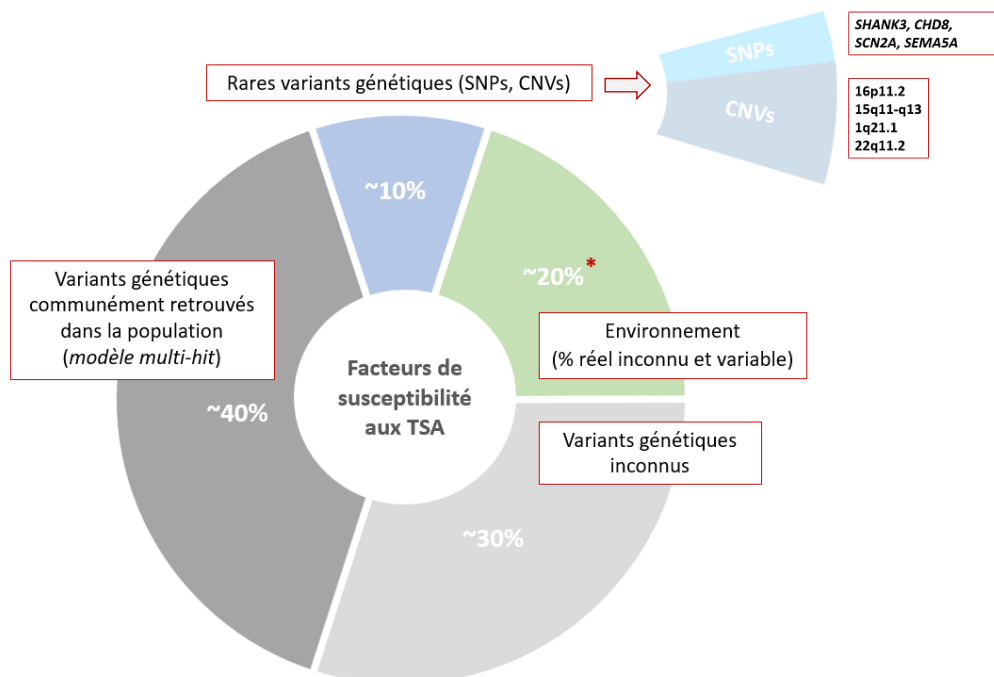


Figure 12 : Représentation simplifiée des différents facteurs de susceptibilité à l'autisme. Les pourcentages affichés représentent les estimations de la littérature scientifique et peuvent varier en fonctions des études. *La part de l'environnement est représentée suivant les données sur l'héritabilité de l'autisme mais sa contribution réelle aux TSA est inconnue et très variable. SNPs : *Single Nucleotide Polymorphisms*, CNVs : *Copy Number Variants*. Composition originale à partir de Ramaswami & Geschwind, 2018, Gaugler et al., 2014 et Bai et al., 2019

c- Les SNPs

Les SNPs sont des variations d'une seule paire de bases dans la séquence d'un gène pouvant impacter la fonction du gène. Leur étude dans des cohortes à grande échelle par des techniques d'association pangénomique (GWAS pour *Genome-Wide Association Study*) permet d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans l'étiologie des TSA. La base de données SFARI Gene (*Simons Foundation Autism Research Initiative Gene*) (SFARI Gene, <https://gene.sfari.org/>) répertorie 1140 gènes plus ou moins fortement associés au développement de l'autisme. Parmi ces gènes, se trouve *SHANK3* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) impliqué dans le transport post-synaptique et dont l'altération est responsable du syndrome de Phelan-McDermid, fréquemment associé à l'autisme (Durand et al., 2007 ; Phelan & McDermid., 2012). Des variants dans le gène *CHD8* (*chromodomain helicase DNA binding protein 8*), impliqué dans le remodelage de la chromatine, ont été également fortement associés aux TSA (O'Roak et al., 2012a ; O'Roak et al., 2012b).

D'autres gènes de la connectivité neuronale sont retrouvés impliqués dans l'autisme comme le gène *SCN2A* codant le canal sodique voltage dépendant Nav1.2 (Weiss et al., 2003 ; Iossifov et al., 2015) et le gène *SEMA5A*, codant pour la sémaphorine 5A, une protéine impliquée dans le guidage axonal et la synaptogénèse (Weiss et al., 2009 ; Mosca-Boidron et al., 2016, Duan et al., 2014).

Enfin, une partie des SNPs impliqués dans l'autisme impacte des régions non codantes du génome, pouvant affecter la régulation génétique (Golovina et al., 2021), ajoutant une couche de complexité sur l'étiologie des TSA.

De manière générale, les études à grande échelle des différents variants observés dans l'autisme permettent de dresser un portrait fonctionnel des gènes impliqués dans l'autisme. Ces gènes sont ceux impliqués dans la régulation de l'expression génique, incluant les régulateurs de la chromatine et les facteurs de transcription, et ceux impliqués dans la communication neuronale, incluant la fonction synaptique (De Rubeis et al., 2014, Satterstrom et al., 2020).

d- L'autisme syndromique

Une partie de l'origine génétique de l'autisme provient de syndromes génétiques bien identifiés dont l'autisme constitue alors une comorbidité fréquemment associée. Cette forme d'autisme est appelée autisme syndromique. On y retrouve notamment la trisomie 21, avec 16-18% des individus présentant un diagnostic TSA (Richards et al., 2015, Spinazzi et al., 2023) et le syndrome de l'X fragile, affectant 0.14% de la population mâle (Hunter et al., 2014) et dont 30% à 60% des patients présentent un diagnostic TSA (Harris et al., 2008 ; McDuffie et al., 2015). Le syndrome de l'X fragile est la première cause génétique d'autisme impliquant un seul gène (Marlborough et al., 2021). Enfin, malgré son retrait du DSM-V, le syndrome de Rett est, dans environ 17 à 58% des cas, associé à un diagnostic TSA, ce qui en fait un syndrome restant étroitement lié à l'autisme (Young et al., 2008 ; Wulffaert et al., 2009).

2. Les causes environnementales

a- Age parental

Un âge parental avancé (notamment l'âge paternel) joue un rôle significatif dans l'incidence de l'autisme chez le nouveau-né (Karimi et al., 2017). Dans une étude par méta-analyse, Wu et collaborateurs ont démontré que chaque augmentation de 10 ans de l'âge maternel et paternel accroît

le risque de TSA chez la descendance de 18 % et 21 % respectivement (Wu et al., 2016). L'explication probable de ce phénomène serait la formation de mutations *de novo* ainsi que des modifications de la méthylation de l'ADN dans les cellules germinales pouvant alors contribuer au développement des TSA (Reichenberg et al., 2006).

b- Facteurs de risque maternels

- **Syndrome métabolique maternel** : Le syndrome métabolique regroupe un ensemble d'atteintes physiologiques comprenant l'obésité, l'hypertension et le diabète. Un syndrome métabolique chez la mère pendant la grossesse est associé à un risque accru de troubles neurodéveloppementaux chez la descendance dont les TSA (Krakowiak et al., 2012). De façon plus précise, l'obésité maternelle ainsi qu'une forte prise de poids durant la grossesse augmentent le risque de TSA chez la descendance (Gardner et al., 2015 ; Wang et al., 2016). Par ailleurs, un diagnostic maternel préexistant de diabète de type II et le développement du diabète gestationnel pendant la grossesse sont associés à un risque accru de développement de TSA chez la descendance (Xiang et al., 2015).

- **Infection ou activation immunitaire** : Lee et collaborateurs ont réalisé une étude à très grande échelle (plus de 2 millions d'individus dont 24 000 personnes avec TSA) et ont montré que la présence d'une infection maternelle survenue durant la grossesse et ayant nécessité une hospitalisation augmente de 30% le risque d'apparition de TSA chez la descendance (Lee et al., 2015). Dans leur étude par méta-analyse, Jiang et collaborateurs confirment l'association positive entre infection maternelle pendant la grossesse et autisme, le risque étant plus grand pour les infections ayant nécessité une hospitalisation (Jiang et al., 2016).

c- Environnement foetal

- **Exposition à l'alcool** : Le lien entre consommation d'alcool pendant la grossesse et troubles neurodéveloppementaux est bien démontré (Mattson & Riley, 1998). Cependant, son association avec le développement de l'autisme n'est, étonnamment, pas si marquée. Plusieurs études rétrospectives ne montrent pas d'association entre la consommation modérée d'alcool par les mères et le diagnostic TSA de l'enfant (Visser et al., 2012 ; Singer et al., 2017). Ces études, basées sur les auto-questionnaires des mères, n'excluent pas un possible biais lié à la véracité des réponses chez les mères dont l'enfant est atteint de TSA. Toutefois, le syndrome d'alcoolisation foetale, un trouble développemental dû à une forte consommation d'alcool durant la grossesse, est associé aux TSA chez 2,3% (Green et al., 2009) à 9% (Landgren et al., 2010) des cas.

- **Médication** : La prise de médicament pendant la grossesse peut augmenter les risques de développer des TSA. L'exemple le plus connu et caractérisé est celui de l'exposition *in utero* à l'acide valproïque (valproate, VPA ou Dépakine sous son nom commercial). Cet anticonvulsif prescrit aux

mères épileptiques est un tératogène dont la prise durant la grossesse est fortement associée à des troubles développementaux et en particulier de l'autisme chez la descendance (Bromley et al., 2013 ; Christensen et al., 2013 ; Gentil, 2014).

- **Etat nutritionnel maternel** : L'état nutritionnel de la mère pendant la grossesse impacte le développement de l'enfant. Ainsi, un intervalle court entre deux grossesses peut appauvrir la mère en nutriments et associer la deuxième grossesse à un risque accru de TSA (Conde-Agudelo et al., 2016). De la même manière, des déficits en fer ou en acide folique (folate) durant la grossesse ont été associés respectivement à un risque accru de développer de l'autisme (Wiegersma et al., 2019) et des troubles neurodéveloppementaux (Blom, 2009). La supplémentation en acide folique durant la grossesse réduit le risque de TSA (Surén et al., 2013 ; Pugsley et al., 2022) et il est d'ailleurs maintenant assez courant pour les femmes enceintes de se supplémenter légèrement en acide folique tout au long de leur grossesse.

d- Autres

- **L'immigration maternelle** : Dans une revue systématique portant sur l'association entre l'immigration maternelle et le risque de TSA, Crafa et Varfa ont montré des taux plus élevés de TSA chez les enfants de mères immigrantes (2,69%) par rapport à ceux des enfants de mères non migrantes (0,91%), à l'exception des enfants nés de mères migrantes hispaniques qui avaient des taux plus bas de TSA (Crafa & Varfa, 2015). Ce risque plus élevé pourrait potentiellement être dû à des modifications épigénétiques résultant des facteurs de stress associés à l'expérience de l'immigration (Crafa & Varfa, 2015).

- **Les vaccins ?** : Pour conclure cette partie, il me semble important de rappeler ici que les vaccins ne sont pas considérés comme un facteur de risque pour l'autisme.

Cette idée provient d'une étude menée par l'(ex) Dr. Andrew Wakefield et publiée en 1998 dans *The Lancet*. Cette étude suggérait un lien possible entre le vaccin ROR (rougeole, oreillons, rubéole) et l'apparition de l'autisme chez les enfants (Wakefield et al., 1998 RETRACTED). Cependant, des problèmes concernant la méthodologie et les conflits d'intérêts de Wakefield sont rapidement apparus. Après une enquête approfondie, il a été découvert que Wakefield avait manipulé des données et avait des intérêts financiers non déclarés (Deer, 2011). En 2010, le *General Medical Council* du Royaume-Uni a jugé Wakefield « malhonnête, non-éthique et inhumain ». Il est alors radié du registre médical britannique et son étude retirée. Réfugié actuellement au Texas, A. Wakefield continue d'alimenter la peur des vaccins par de très nombreuses conférences, livres et même films. Son étude, pendant les 13 ans durant lesquels elle fut en circulation, a fait, et continue de faire, d'immenses dégâts à la couverture vaccinale du ROR, notamment aux États-Unis et au Royaume-Uni (Smith et al., 2008). En 2017, la plus grande épidémie de rougeole aux États-Unis depuis des décennies a eu lieu dans la communauté Somalienne du Minnesota, où la couverture vaccinale était tombée à 42% en 2016, directement liée aux fausses informations sur le lien entre ROR et autisme qui circulaient dans cette communauté (Banerjee et al., 2020). Aujourd'hui, de nombreuses études ont montré une absence de lien entre le vaccin ROR et le développement de l'autisme (Taylor et al., 2014 ; Hviid et al.,

2019) mais la controverse d'Andrew Wakefield reste un exemple sur la manière dont une information faussée et frauduleuse peut avoir des conséquences graves sur la santé publique, et persistante malgré sa réfutation.

3. L'épigénétique

Récemment, un intérêt grandissant est porté sur le rôle possible d'altérations épigénétiques dans l'étiologie de certains troubles neurodéveloppementaux et notamment dans les TSA (Levy et al., 2022). En effet, à l'instar de *CHD8*, certains gènes de susceptibilité à l'autisme, jouent un rôle dans des mécanismes épigénétiques, comme *MECP2*, gène derrière le syndrome de Rett dont la protéine MeCP2 se lie à l'ADN méthylé et agit comme régulateurs de transcription (Yasui et al., 2007). Par ailleurs, des profils de méthylation de l'ADN différents ont été observés entre des individus TSA et contrôles (Wong et al., 2013). En 2019, Zhu et collaborateurs ont identifié, dans des échantillons de placentas d'enfants avec TSA, 400 régions génomiques différemment méthylées (par rapport au placenta d'enfants neurotypiques), affectant des gènes liés au développement neuronal (Zhu et al., 2019). Encore mal comprise et à ses débuts, l'étude de l'épigénétique dans l'autisme est un champ de recherche prometteur et permettrait de mieux décrypter l'influence de l'environnement dans les TSA (Masini et al., 2020).

III. Les modèles animaux des TSA

L'identification des différentes causes des TSA a permis de mettre au point des modèles animaux d'autisme aujourd'hui couramment utilisés pour élucider les différents aspects physiopathologiques des TSA. Ces modèles sont pour la grande majorité des modèles murins ou de poisson zèbres, mais d'autres modèles utilisant d'autres espèces animales existent (drosophiles, chien, oiseaux) (Li et al., 2021). La modélisation de l'autisme chez l'animal doit récapituler les symptômes principaux de l'autisme, et notamment les déficits dans les interactions sociales, et les comportements stéréotypés. Cette partie du manuscrit présente brièvement les modèles les plus couramment utilisés dans la recherche sur l'autisme.

1. Les modèles génétiques

Chez ces modèles, on retrouve des animaux (principalement souris ou poissons-zèbres) invalidés pour des gènes fortement associés aux TSA, comme *CHD8* et *SHANK3* (Bernier et al., 2014 ;

Katayama et al., 2016 ; Peça et al., 2011 ; James et al., 2019). Il existe plusieurs modèles murins KO pour le gène *SHANK3*, présentant des sévérités de phénotype différents en fonction de la localisation de la mutation sur le gène. Par exemple, les souris invalidées au niveau de la région PDZ du gène ont des phénotypes nettement plus graves, notamment un auto-toilettage spontané intense (comportements stéréotypés) conduisant à des lésions cutanées (Fig. 13A, B), ainsi qu'une altération de la sociabilité associée à des altérations de transmission synaptique (Peça et al., 2011). Le gène *SHANK3* est un très bon exemple de la variabilité de phénotypes possibles en fonction de la localisation de la mutation, variabilité que l'on retrouve aussi chez les humains (Crawley et al., 2012).

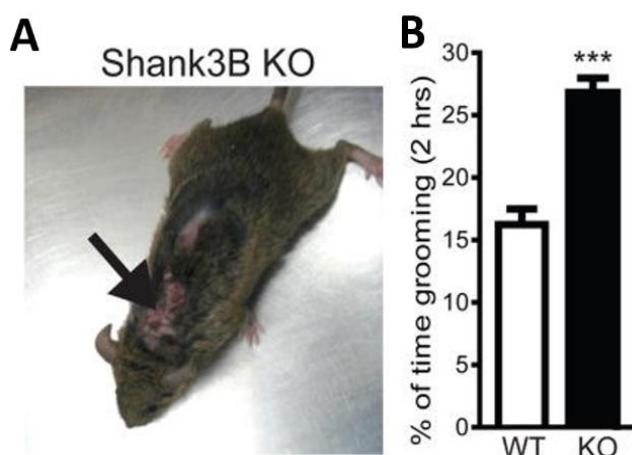


Figure 13 : (A) Visualisation des comportements de toilettage extrêmement exacerbés chez les souris invalidées pour le gène de susceptibilité à l'autisme *Shank3*. Le toilettage excessif crée des lésions cutanées chez la souris. (B) Représentation graphique du temps consacré au toilettage chez ces souris (KO) par rapport au contrôle (WT). Tiré de Peça et al., 2011.

2. Les modèles environnementaux

Le modèle environnemental le plus utilisé est basé sur l'exposition pré- ou péri-natale de souriceaux à l'acide valproïque (VPA), conduisant à des troubles neurodéveloppementaux et à des déficits sociaux et des comportements répétitifs chez les petits (Gandal et al., 2010 ; Kim et al., 2013). Ce modèle d'exposition au VPA est aussi transférable à des modèles de poisson-zèbre. Les poissons exposés au VPA au stade larvaire présentent des altérations sociales, de l'hyperactivité et une augmentation de l'anxiété. Cependant, l'exposition au VPA reste très dommageable pour les larves et doit être réalisée à des concentrations et suivant un timing précis (Joseph et al., 2022).

Un autre modèle se base sur le risque que provoque l'obésité maternelle avec un modèle d'alimentation riche en graisse chez les souris gestantes (*Maternal High Fat Diet* ou MHFD avec 40 à 60% de l'apport énergétique provenant des graisses) (Urbonaite et al., 2022), conduisant chez la descendance à des troubles neurodéveloppementaux associés à des déficits sociaux. Les mécanismes derrière les altérations neurodéveloppementales de la MHFD ne sont pas encore bien compris mais pourraient découler du stress inflammatoire causé par ce régime (Duan et al., 2018 ; Urbonaite et al., 2022).

Restant dans le contexte inflammatoire, un modèle d'activation immunitaire maternelle (*Maternal Immune Activation* ou MIA) par inoculation d'un mimétique viral (ex : poly(I:C) pour polyinosinic-polycytidylic acid) ou de LPS pendant la période de gestation, permet également d'induire chez la descendance des déficits sociaux et une augmentation des comportements stéréotypés comme le toilettage (Patterson, 2011 ; Malkova et al., 2012).

3. Les modèles d'autisme syndromique et idiopathique

a- Modèles d'autisme syndromique

Chez les modèles d'autisme syndromique, on retrouve des modèles murins invalidés pour les gènes *Mecp2* et *Fmr1* modélisant respectivement le syndrome de Rett et le syndrome de l'X fragile, deux pathologies génétiques fortement associées à l'autisme. Ces modèles présentent tous deux des déficits sociaux et des stéréotypies exacerbées (Bhattacharya et al., 2012 ; Zang et al., 2009 ; Guy et al., 2007 ; Moretti et al., 2005).

b- Modèle d'autisme idiopathique

Des modèles d'autisme idiopathique (soit des modèles dont la cause des caractéristiques autistiques n'est pas identifiée) ont été obtenus chez des lignées consanguines de rongeurs exprimant des traits phénotypiques pertinents pour l'autisme. La lignée la plus fréquemment utilisée est la lignée de souris BTBR T+tf/J (*Black and Tan BRachyury*, nom faisant référence à leur apparence). Ces souris présentent des déficits dans des domaines tels que l'interaction sociale, le jeu, la communication sociale (vocalisation) et le toilettage, ainsi que des comportements répétitifs (MacFarlane et al., 2008 ; Yang et al., 2007 ; Ergaz et al., 2016). Cette lignée murine présente un grand nombre de variations génétiques dont la contribution aux phénotypes autistiques n'est pas clairement identifiée (MacFarlane et al., 2008), faisant de la souris BTBR un modèle non seulement phénotypiquement robuste, mais aussi étiologiquement représentatif de la majorité des cas d'autisme chez les humains (« multi-hit » avec variants génétiques inconnus).

IV. Les atteintes centrales et les comorbidités psychiatriques associées à l'autisme

Même si les TSA sont officiellement définis par une liste précise de symptômes comportementaux, des atteintes centrales accompagnées d'une grande diversité de comorbidités psychiatriques et digestives sont observées chez les individus TSA.

1. Les atteintes centrales observées dans les TSA

L'étude fonctionnelle par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) du cerveau des individus avec autisme montre un certain nombre de différences anatomo-fonctionnelles. Ainsi, Carlisi et collaborateurs montrent, par IRMf, une réduction de la substance grise au niveau du cervelet, de l'hippocampe, de l'amygdale, et du lobe pariétal, accompagnée d'une augmentation du volume de la substance grise dans les régions frontales, striatales et temporales (Carlisi et al., 2017). De plus, Anderson et collaborateurs indiquent une réduction du volume du corps calleux chez des individus hommes adultes présentant un autisme de haut niveau comparé à des hommes adultes neurotypiques (Anderson et al., 2011). Dans une autre étude, Riddle et collaborateurs montrent une augmentation légère du volume total du cerveau d'enfants avec TSA par rapport aux contrôles, due à un élargissement du volume de la substance grise sans spécificité de régions cérébrales (Riddle et al., 2017). De plus, Holiga et collaborateurs indiquent des altérations de la connectivité cérébrales, incluant des régions cérébrales avec hypoconnectivité, telles que les régions sensori-motrices, et avec hyperconnectivité au niveau des cortex pariétaux et frontaux des individus TSA (Holiga et al., 2019).

Il reste cependant très difficile de dresser une anatomie corticale type de l'autisme en raison de la très forte hétérogénéité du spectre autistique et de la grande diversité de son étiologie.

De manière intéressante, des atteintes anatomiques cérébrales sont également observées chez certains modèles animaux des TSA. Nous pouvons citer en exemple les souris BTBR qui présentent une absence de corps calleux et une réduction de la taille de la commissure hippocampique, reliant les deux moitiés de l'hippocampe (Wahlsten et al., 2003). De même, les souris porteuses d'altérations du nombre de copies dans la région 16p11.2, fortement associée à l'autisme, présentent des altérations structurelles et volumiques de certaines régions neuroanatomiques (Kretz et al., 2023 ; Horev et al., 2011).

2. Les comorbidités psychiatriques et neurologiques

Dans les TSA, de nombreuses comorbidités comportementales ou neurodéveloppementales, différentes des 5 critères diagnostiques des TSA décrits en début de ce chapitre, sont observées. Ces comorbidités renforcent la sévérité du phénotype chez les individus TSA et constituent un challenge dans la prise en charge des patients.

On retrouve ainsi une déficience intellectuelle chez environ 45% des patients, un déficit de l'attention et troubles de l'hyperactivité (ADHD) chez 28 à 44% des cas ou bien des tics (troubles involontaires compulsifs) chez 14-38% des individus. L'anxiété constitue aussi une part très importante des comorbidités psychiatriques de l'autisme puisque 42 à 56% des individus TSA en souffrent. Cette anxiété semble toucher tous les groupes d'âge et peut être dirigée vers des situations sociales (13-29%) ou bien être généralisée (13-22%) (Lai et al., 2014). Les troubles du comportement alimentaire

et des préférences ou aversions de nourriture sont aussi reconnus dans l'autisme (Marí-Bauset et al., 2014).

Des troubles neuropsychiatriques comme des troubles du spectre schizophrénique, touchent entre 0 et 34.8% des individus TSA en fonction des études (Chisholm et al., 2015). Des troubles neurologiques comme l'épilepsie sont aussi très fréquemment liés à l'autisme, étant retrouvés chez 5 à 40% des individus (Tuchman & Rapin, 2002),

V. Les atteintes entériques et digestives associées à l'autisme

D'autres comorbidités physiologiques sont aussi retrouvées et occupent une place prépondérante dans l'autisme, dont notamment des troubles gastrointestinaux.

1. Les troubles gastrointestinaux associés à l'autisme

Les troubles gastrointestinaux (GI) chroniques constituent l'une des comorbidités les plus communes de l'autisme. En effet, selon les études, entre 4.2% à 96.8% des individus avec TSA présentent des atteintes digestives (Holingue et al., 2018), avec une moyenne de la littérature se situant autour des 50-70% (Gan et al., 2023 ; Lai et al., 2014). Dans une étude par méta-analyse portant sur un total de 4 723 enfants avec TSA, 55% des individus présentaient des troubles GI (comparé à 26% chez les enfants contrôles) avec pour les atteintes les plus fréquemment observées : la constipation (25%), les douleurs abdominales (22%), la diarrhée et la nausée (22 et 20%) et enfin les ballonnements (11%). L'occurrence élevée de ces troubles dans l'autisme est retrouvée dans de nombreuses autres études (Kang et al., 2017 ; Ferguson et al., 2019 ; Restrepo et al., 2020 ; Reynolds et al., 2021).

Les patients présentant des troubles GI ont tendance à montrer un retrait social plus marqué et une exacerbation d'autres troubles comportementaux, tels que l'irritabilité et des troubles du sommeil (Madra et al., 2020 ; Restrepo et al., 2020, Chaidez et al., 2014). De plus, une corrélation semble exister entre la sévérité de ces troubles GI et la sévérité des symptômes comportementaux de l'autisme (Adams et al., 2011 ; Reynolds et al., 2021).

Ainsi, la détresse gastro-intestinale ressentie par les enfants atteints de TSA pourrait jouer un rôle significatif dans les problèmes comportementaux associés à l'autisme (Madra et al., 2020). Cette comorbidité est d'autant plus importante qu'elle peut aisément passer inaperçue, camouflée par les autres symptômes de l'autisme ou mal expliquée par les patients (individus non verbaux et difficulté à communiquer).

Une hypothèse visant à expliquer la prévalence de telles atteintes digestives s'appuie sur les troubles psychiatriques et comportementaux associés aux TSA. En effet, les troubles du comportement alimentaire et les spécificités alimentaires, dues à des préférences sensorielles pour certains aliments en particulier ("*picky eaters*"), sont couramment retrouvés chez les individus avec autisme (Ibrahim et al., 2009). Ainsi, les enfants avec autisme seraient plus enclins à subir des carences en protéines et en vitamines (Esteban-Figuerola et al., 2019). Cependant, une étude de 2019 menée sur 120 enfants avec autisme par Ferguson et collaborateurs conclut à une absence de lien entre les spécificités alimentaires et les apports nutritionnels et les troubles GI observés (Ferguson et al., 2019).

2. Atteintes de la physiologie digestive

a- Modification de la perméabilité intestinale

Des anomalies de la perméabilité intestinale sont signalées chez les individus avec autisme. En effet, plusieurs études montrent une augmentation de la perméabilité intestinale chez des enfants avec TSA (de Magistris et al., 2010 ; D'Eufemia et al., 1996 ; Boukthir et al., 2010). La perméabilité intestinale est évaluée par le test lactulose/mannitol basé sur la mesure du taux de ces deux sucres dans les urines après ingestion à jeun. Le lactulose, un disaccharide volumineux, franchit difficilement la barrière épithéliale intestinale (BEI), contrairement au mannitol, un petit monosaccharide qui la traverse aisément par la voie transcellulaire. Un ratio lactulose/mannitol élevé indiquant une perméabilité accrue de l'intestin a été retrouvé dans les études sur les patients TSA. De plus, la zonuline, une protéine associée à la régulation de la perméabilité intestinale, a été observée à des taux sanguin anormalement élevés chez les sujets TSA présentant des troubles GI comparativement à une population contrôle. De manière intéressante, ces taux de zonuline sanguin étaient corrélés avec la sévérité du score TSA (échelle CARS) chez les individus TSA (Esnafoğlu et al., 2017).

Cette augmentation de la perméabilité intestinale pourrait favoriser le passage de molécules potentiellement nocives, contribuant aux troubles digestifs observés dans les TSA (Al-Ayadhi et al., 2021). Cependant, ce modèle du « *leaky gut* » dans l'autisme reste discuté par d'autres études ne montrant pas de modification de la perméabilité intestinale dans leur cohorte TSA (Robertson et al., 2008 ; Pusponogoro et al., 2015). La diversité de ces résultats pourrait être due à la grande variabilité de l'autisme et de ses comorbidités. En effet, certains auteurs dans leurs études indiquent que seule une partie de leur cohorte TSA montrait une augmentation de la perméabilité intestinale (de Magistris et al., 2010 ; Gabriele et al., 2015).

Chez les modèles animaux de l'autisme, des altérations de la perméabilité intestinale sont aussi retrouvées. Ainsi, chez les souris MIA (Hsiao et al., 2013) et les souris BTBR (Golubeva et al., 2017), une

augmentation de la perméabilité intestinale est associée à une altération de marqueurs de l'intégrité de la BEI (protéines des jonctions serrées).

b- Modification de la motricité intestinale

La grande prévalence des troubles diarrhéiques et de la constipation chez les individus avec autisme peut être associée à des problèmes de motricité intestinale. La constipation étant généralement associée à un ralentissement du transit alors que la diarrhée est associée à une accélération du transit. Pourtant, les liens directs entre symptôme constipatoire/diarrhéique et mesure de la motricité digestive chez les personnes avec autisme manquent. Dans cette situation, les modèles animaux permettent des études directes de la motricité digestive. Un très bon exemple est le modèle de poisson-zèbre invalidé pour le gène *chd8*, présentant une diminution du temps de transit récapitulant les symptômes décrits chez les humains porteurs de variations génétiques sur ce gène. Ces mutations de *CHD8* constituent un sous-groupe précis d'individus avec TSA présentant une macrocéphalie et des troubles gastro-intestinaux chez 80% des cas. Plus précisément, ces atteintes GI sont représentées chez 60% des individus par des périodes récurrentes de forte constipation (Bernier et al., 2014 ; Douzgou et al., 2019). Une même réduction du transit intestinal est observée chez le modèle poisson-zèbre invalidé pour le gène *shank3* (James et al., 2019).

Chez le rat, l'exposition au VPA induit chez la descendance une diminution du transit intestinal associée à une atrophie de la tunique musculaire dans l'estomac et l'iléon (Kim et al., 2013).

À l'inverse, les souris BTBR présentent une augmentation du transit intestinal mais une diminution du transit colique (Golubeva et al., 2017). Les souris invalidées pour le gène de susceptibilité à l'autisme *Nlgn3* (codant la protéine synaptique Neuroligin-3) présentent également une accélération du transit intestinal et colique (Hosie et al., 2019 ; Leembruggen et al., 2020).

Dans ce contexte d'atteinte de la physiologie digestive, il est essentiel de considérer le SNE qui est partie intégrante des fonctions digestives.

3. Atteintes du SNE

A l'heure où ces lignes sont écrites (17h34 pour ceux que ça intéresse), aucune donnée directe n'existe sur l'état anatomo-fonctionnel du SNE chez les individus avec TSA. Néanmoins, l'étude des modèles animaux permet de mettre en lumière certaines altérations du SNE.

C'est le cas pour le modèle de poisson-zèbre muté pour le gène *chd8* décrit précédemment. La réduction du transit intestinal chez ces poissons est accompagnée d'une diminution d'environ 50% du nombre de neurones entériques tout au long du tube digestif (Fig. 14A) (Bernier et al., 2014). Récemment, Hayot et collaborateurs ont montré que cette diminution provient d'événements très précoces dans le développement du SNE avec une réduction du nombre de cellules de la crête neurale vagale et des précurseurs neuronaux émigrant du tube neural. Une diminution des neurones sérotoninergiques dérivés des cellules de la crête neurale vagale est aussi observée (Hayot et al., 2023)

Chez des souris porteuses d'une mutation pour le gène de susceptibilité à l'autisme *SLC6A4* (codant le transporteur de la sérotonine SERT) et induisant une sur-recapture de la sérotonine (donc une diminution de la sérotonine circulante), une diminution du nombre de neurones entériques dans le plexus myentérique et sous-muqueux est observée comparées aux souris WT (Margolis et al., 2016).

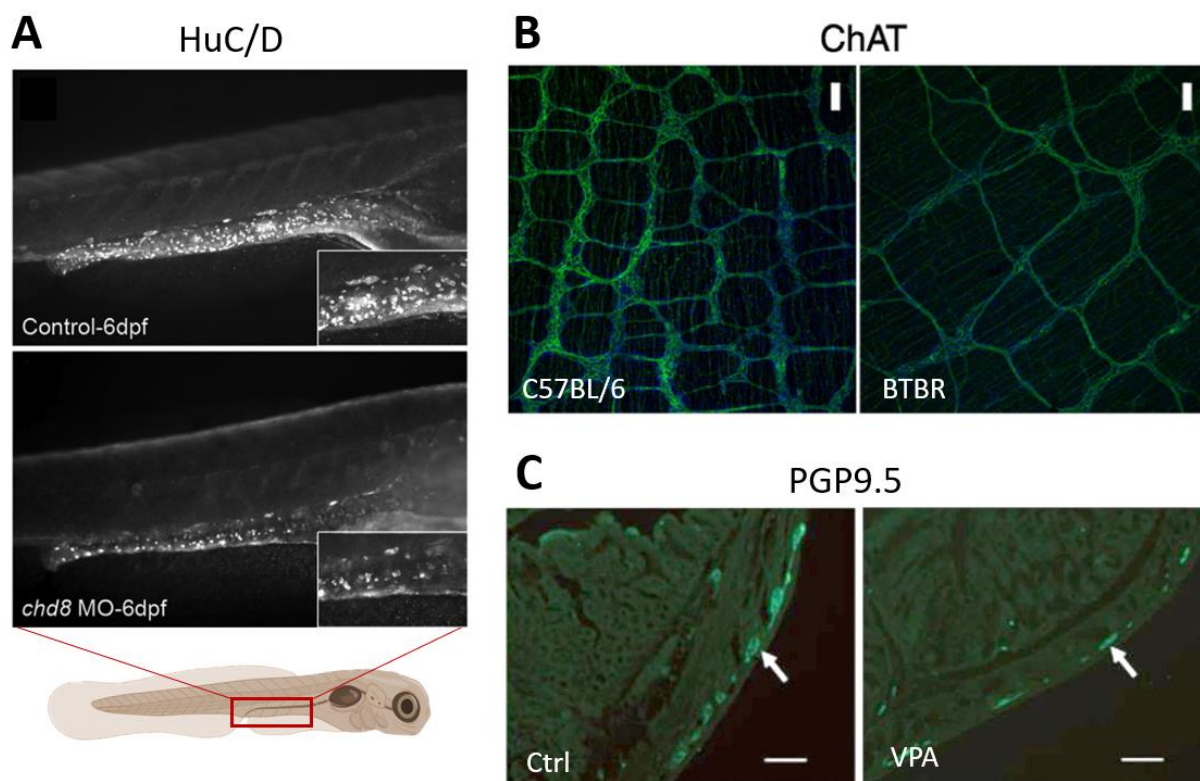


Figure 14 : Exemples d'atteintes du SNE chez des modèles animaux des TSA. (A) Les larves de poisson zèbre invalidées pour le gène de susceptibilité à l'autisme *chd8*, présentent une diminution du nombre de neurones entériques à 6 jours post-fécondation (visible ici en immunomarquage pour la protéine neuronale HuC/D). (B) Immunomarquage anti-ChAt (Choline Acétyltransférase en vert) sur le colon distal de souris BTBR ou contrôles (C57BL/6). Les noyaux sont colorés en bleu (DAPI). Le SNE des souris BTBR présente une réduction de la densité spatiale du plexus myentérique avec une augmentation de l'espace interganglionnaire. (C) Visualisation du plexus myentérique de colon de rat exposé ou non à l'acide valproïque (VPA). Les rats exposés au VPA présentent une réduction de la taille du plexus, vue en immunomarquage pour la protéine neuronale PGP9.5 (vert), comparé aux contrôles. Tirés de Bernier et al., 2014 (A), Golubeva et al., 2017 (B) et Cheng et al., 2020 (C).

Chez le modèle BTBR, les souris présentent une altération du SNE caractérisée par une diminution de la densité spatiale du plexus myentérique (Fig. 14B) et une diminution du nombre de neurones, dont une perte de 50% des motoneurones inhibiteurs nNOS+. Ces résultats évoquent chez ce modèle un potentiel déséquilibre de la balance excitation/inhibition nécessaire à un fonctionnement digestif physiologique (Golubeva et al., 2017). Une même observation d'une réduction du nombre de neurones nitrergiques est rapportée par Hosie et collaborateurs chez les souris NL3^{R451C} (mutées pour *Nlgn3*) présentant une accélération du transit, avec une diminution de 30% du nombre de neurones entériques par ganglion, et plus précisément, une diminution de la proportion de neurones NOS+ (Hosie et al., 2019).

Enfin, chez les modèles murins exposés au valproate, le transit intestinal est ralenti (Kim et al., 2013 ; Cheng et al., 2020) et une diminution du nombre de neurones entériques a été observée dans le colon de ces animaux (Fig.14C) (Cheng et al., 2020)

Ainsi, les troubles GI dans l'autisme constituent un défi dans la prise en charge des individus avec TSA et suscitent un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique. L'origine des troubles GI dans l'autisme est encore mal comprise. Si les troubles du comportement alimentaire ou d'autres comorbidités peuvent être, dans une certaine mesure, incriminés dans leur étiologie, les modèles animaux de l'autisme dont l'alimentation est parfaitement régulée et uniforme montrent également des atteintes digestives, indiquant une comorbidité intimement liée à l'autisme lui-même. Alors, entre facteurs génétiques et environnementaux pouvant affecter l'axe intestin-cerveau, l'étiologie de ces troubles GI semble tout aussi complexe que l'autisme lui-même.

Récemment cependant, un acteur de la physiologie intestinale et de l'axe intestin-cerveau émerge comme un élément grandissant et prometteur dans la recherche sur les TSA : **le microbiote intestinal.**

Chapitre 3: Le Microbiote Intestinal

« Faites donc penser un cerveau tout seul, voyez donc ce que devient la noblesse du cerveau, quand le ventre est malade ! »

Emile Zola dans « L'œuvre » - 1886

-Partie 1 : Présentation générale du microbiote intestinal -

I. Introduction générale

1. Présentation :

Le microbiote désigne l'ensemble des micro-organismes présents et co-existants dans un environnement spécifique. Dans le corps humain, ces micro-organismes se composent principalement de bactéries, d'archées, de virus, d'eucaryotes unicellulaires et de champignons, couvrant toutes les surfaces et les cavités en contact avec le monde extérieur. Ainsi, plutôt que d'avoir un seul microbiote, notre espèce possède plusieurs microbiotes distincts pour chaque partie du corps colonisée, comme la peau, la bouche, les poumons, le vagin, etc. L'ensemble des micro-organismes résidant dans notre système digestif est appelé microbiote intestinal (MI) (Le Dréan et al., 2021).

Le MI est le plus reconnu et le plus impressionnant. En effet, avec un poids estimé à 0,2 kg, près de 39 000 milliards de bactéries (environ autant que de cellules humaines) (Sender et al., 2016), appartenant à environ un millier d'espèces (Qin et al., 2010 ; Yang et al., 2020) et rassemblant plus de 600 000 gènes (environ 25 fois plus que les 23 000 gènes retrouvés chez Homo sapiens, rendant notre espèce plus « bactérienne » qu'humaine) (Qin et al., 2010), le microbiote intestinal se présente comme un organe à part entière, étroitement lié à la physiologie de son hôte.

La colonisation du tube digestif par les bactéries n'est pas la même tout au long du tractus intestinal. En effet, les bactéries, sensibles à leur environnement, présentent une diversité de densité et d'espèces en fonction des différentes conditions de pH, de nutriments disponibles, de mucus, de temps de transit, et surtout, du taux d'oxygène (Martinez-Guryn et al., 2019). Ainsi, chez un individu sain, on retrouve une densité et une diversité des espèces croissante de la bouche à l'anus, partant de 10^1 - 10^5 bactéries/mL de contenu stomacal dans l'estomac, à 10^{12} - 10^{14} bactéries/g de fèces dans le gros intestin qui présente une condition anaérobie (Biedermann & Rogler, 2015).

2. Historique de la découverte du microbiote intestinal

La découverte du MI s’amorce en 1681 avec les premières observations microscopiques « d’animalcules » vivants par Antonie van Leeuwenhoek sur des échantillons de ses propres selles. Malgré ce départ précoce, ce n’est qu’à partir du milieu du 19^{ème} siècle que l’observation des bactéries du système digestif prend de la vitesse. Ainsi, en 1842, le chirurgien écossais John Goodsir découvre et nomme la bactérie *Sarcina ventriculi* en étudiant les fluides stomacaux d’un patient. Persuadé de la responsabilité de ce microorganisme dans les affections de son patient, il procédera à un traitement antiseptique à base de créosote (un mélange d’huiles phénolées extraites de charbon ou de goudron de bois) (Goodsir & Wilson, 1842). En 1867, en Angleterre, Lionel Smith Beale signale la présence de microorganismes dans l’estomac, l’intestin et les selles humaines (Smith Beale, 1867). Puis, en Allemagne, Ernst Hallier et van J. Uffelmann concluent respectivement en 1869 et 1881 qu’un grand nombre de microorganismes étaient présents dans les selles de personnes saines, ainsi que chez les bébés allaités (Farré-Maduell & Casals-Pascual, 2019). Ainsi, l’étrange concept de la flore intestinale humaine se dessine progressivement. À la fin du 19^{ème} siècle, Theodor Escherich identifie *Bacterium coli commune*, renommée *Escherichia coli*, dans les selles d’enfants. Il fut l’un des pionniers du concept de l’existence d’une flore intestinale commensale, décrivant, avec une grande rigueur scientifique, les différentes populations bactériennes dans le système digestif des enfants, leurs évolutions entre la naissance et la petite enfance, et le rôle de cette flore dans la physiologie de la digestion (Escherich, 1886).

Les premières tentatives de traitement par l’administration de « bonnes bactéries », qu’on appellerait aujourd’hui probiotiques, ont eu lieu à la même période et peuvent être attribuées à Henry Tissier de l’institut Pasteur qui identifia des bactéries responsables de la fermentation du lait : *Bifidobacterium*. Il décida d’en administrer quotidiennement une à deux cuillères à des enfants atteints de diarrhée, dans le but de remplacer la flore « malade » par la flore normale des bébés allaités. Dans ses observations cliniques, Tissier établit un lien entre la restauration de la flore normale et l’amélioration des symptômes des nourrissons (conclusions tirées des Annales de l’institut Pasteur, et compilées par Farré-Maduell & Casals-Pascual, 2019). Un peu plus tard, en 1907, Elie Metchnikoff, scientifique d’origine russe établi à l’institut Pasteur, vante les mérites des *Bifidobacterium* présentes dans le lait fermenté. Metchnikoff qui était accablé devant l’espérance de vie des humains, trop courte à son goût, avait attribué la longévité des paysannes bulgares à leur consommation régulière de yaourt. Consommateur lui-même de cette forme de lait fermenté, il prête au yaourt des propriétés anti-âge (Fig. 15) (Metchnikoff, 1908) ce qui contribua grandement à la popularité de cet aliment en France et aux USA (Vikhanski 2016 ; Farré-Maduell & Casals-Pascual, 2019). Il mourut à 71 ans, soit 10 ans plus tôt que prévu par ses propres ambitions de longévité (Vikhanski 2016). Malgré cette riche histoire, ce n’est que depuis le début des années 2000 que la richesse et la complexité des interactions entre la flore intestinale et son hôte sont activement étudiées.

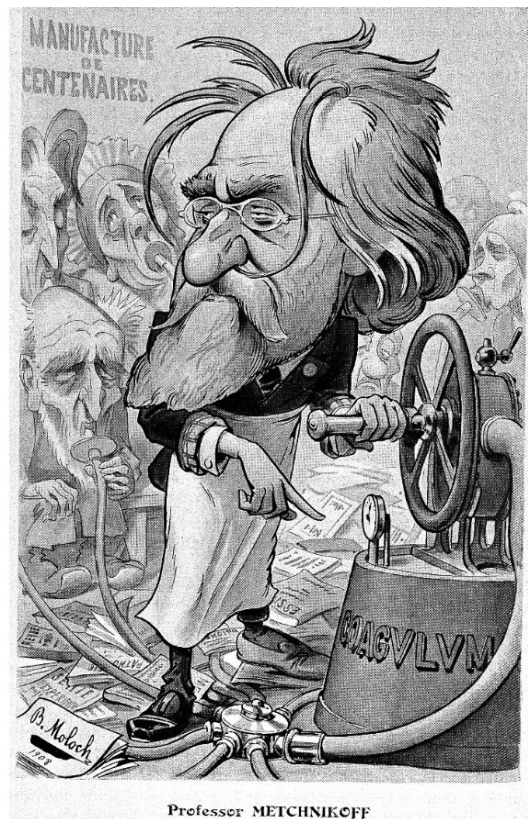


Figure 15 : Dessin caricatural d’Elie Metchnikoff dessiné par Moloch en 1910 et publié dans la revue « Chanteclair » - Domaine public. Coagulum désigne ici le lait coagulé par fermentation lactique, dont les propriétés anti-âges sont louées par Metchnikoff (Lewandowska-Pietruszka et al., 2022).

3. Classification phylogénétique des bactéries du MI

Traditionnellement classées selon leur forme et leur coloration, les progrès en génomique ont permis d’élargir grandement la classification phylogénétique des bactéries. Les bactéries s’intègrent ainsi dans le domaine des procaryotes aux côtés des archées. Il est intéressant de noter que les archées sont aussi présentes dans le MI (principalement des espèces méthanogènes présentes en grande minorité) (Kim et al., 2020) et malgré quelques études tentant de caractériser cet *archaeome* (Nkamga et al., 2017 ; Pausan et al., 2019), ces procaryotes restent les grands oubliés des études sur le MI, et leur impact sur la physiologie de l’hôte reste à être investigué.

Revenons aux bactéries. Elles sont divisées en phyla (au singulier : phylum) puis subdivisées en classe, ordre, famille, genre et enfin, espèces. Chez l’humain en bonne santé, les phyla les plus abondants sont les *Firmicutes* (80 % en moyenne), puis les *Bacteroidetes* (15 %), *Actinobacteria* (2,5 %), *Proteobacteria* (1 %) et les *Verrucomicrobia* (0,1 %) (Tap et al., 2009 ; Manor et al., 2020).

Les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* constituent les phyla les plus représentés chez l'humain. Les *Firmicutes* sont des bactéries majoritairement Gram⁺, comprenant (entre autres) trois classes de bactéries : les *Clostridia* (anaérobies), les *Mollicutes* et les *Bacilli*. Les *Bacteroidetes* représentent des bactéries Gram⁻, dont les classes les plus représentées dans le MI humain, sont les *Bacteroidetes*, *Prevotella* et *Porphyromonas* (Johnson et al., 2017). Le ratio *Firmicute/Bacteroidetes* constitue un outil de caractérisation du MI dans des pathologies métaboliques (Ley et al., 2006 ; O'Toole & Jeffery, 2015). Chez la souris, qui est abondamment utilisée pour l'étude du MI, la composition de la flore intestinale partage 90 % des phyla avec l'humain (grande majorité de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* comme chez l'humain) (Krych et al., 2013). Le phylum majoritaire étant les *Bacteroidetes*, dont la famille majoritaire est les *Muribaculaceae* (aussi connus sous le nom de la famille S24-7) (Park & Im, 2020).

II. Les méthodes d'analyse du MI

1. La culture *in vitro*

La culture des bactéries sur boîtes de Pétri pour identifier la forme et l'apparence des colonies bactériennes est la méthode d'analyse historique. Peu coûteuse et présentant une bonne reproductibilité, elle montre néanmoins rapidement ses limites. En effet, on estime que seulement 20% des bactéries du MI sont cultivables (Ward et al., 1990). Le reste nécessite des conditions de culture non compatibles avec cette méthode (et aussi non identifiées). Cette partie des bactéries "invisibles" est théâtralement appelée "la matière noire microbienne" (*Microbial dark matter*) et constitue un véritable défi en microbiologie (Rinke et al., 2013). Les avancées en analyse génomique permettent de commencer à mieux découvrir ces bactéries, mais on estime à plusieurs millions le nombre d'espèces bactériennes qui n'ont pas encore été découvertes du aux limitations techniques (Louca et al., 2019). Pour donner une idée, plus de 88 % de tous les isolats microbiens appartiennent à seulement quatre phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes*), et on estime à plus de 60 le nombre de phyla existants dans le monde (Rinke et al., 2013).

La culture *in vitro* des bactéries du MI reste néanmoins utilisée pour étudier le comportement des bactéries face à différents composants ou polluants afin de mieux comprendre le rôle du MI dans certaines pathologies dues à des altérations environnementales (Srednicka et al., 2023).

2. Méthodes génomiques

Ces méthodes se basent sur le séquençage de l'ADN bactérien. Il en existe de nombreuses, mais cette partie se concentrera sur deux particulièrement utilisées dans la littérature actuelle : le séquençage 16S et le séquençage Shotgun (métagénomique).

a- Le séquençage 16S

L'ARN 16S représente la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal bactérien. De petite taille, il a été particulièrement bien conservé chez les procaryotes tout en accumulant suffisamment de mutations pour en faire un marqueur génétique robuste d'identification phylogénétique (Lane et al., 1985). L'ARNr 16S présente 9 régions hypervariables (de V1 à V9), chacune flanquée de séquences hautement conservées offrant des sites appropriés pour la liaison des amorces PCR nécessaires à l'amplification (Neefs et al., 1993). Après l'amplification, les séquences hypervariables d'intérêt sont couramment séquencées par Illumina. Cette technique permet un séquençage massif et à haut débit de l'ADN codant pour l'ARN 16S bactérien. Les séquences nucléotidiques obtenues sont ensuite regroupées en unités appelées « Unités Taxonomiques Opérationnelles » (OTUs) en fonction de leur similarité (Fig.16A) (Nguyen et al., 2016). Une identité de séquence OTU supérieure à 97 % (soit jusqu'à 3 % de dissemblance) est estimée comme définissant une espèce. Ce seuil empirique a été défini en 2005 par Konstantinidis et Tiedje dans une étude montrant que la plupart des souches bactériennes avaient une similarité de séquence d'ARNr 16S de 97 % (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Les OTUs avec des similarités de séquence de 95 % et 80 % sont utilisées pour définir respectivement le genre et le phylum (Wensel et al., 2022). L'identification taxonomique est ensuite déduite par alignement des séquences d'ARNr 16S avec des bases de données de référence telles que le « *Ribosomal Database Project* », SILVA, ou Greengenes (Wensel et al., 2022).

b- Le séquençage Shotgun

Contrairement au 16S qui cible des loci (ou sites d'amorces) spécifiques, l'approche Shotgun constitue une approche métagénomique permettant l'analyse de tout l'ADN d'un échantillon donné. Par la technique Shotgun, l'ADN est divisé de manière aléatoire en petits fragments qui sont séquencés indépendamment (ici aussi couramment par Illumina) (Wensel et al., 2022). Les séquences sont ensuite mises bout à bout, reconstituant une séquence continue. Cette séquence est alignée sur une base de données de référence (bases de données disponibles publiquement comme *Reference Sequence* ou *GenBank*) pour identifier les taxons (genres, familles, espèces,...) mais aussi le potentiel fonctionnel en investiguant les régions codantes pour des protéines ou enzymes qui sont utilisées dans les fonctions biologiques bactériennes (Fig. 16B). Ainsi, les données métagénomiques permettent d'explorer simultanément deux aspects d'une communauté microbienne : quelles bactéries sont présentes et qu'est-ce qu'elles sont capables de faire ? (Sharpton, 2014). On peut noter une initiative française, Le French Gut, qui vise à cartographier, par le séquençage Shotgun, les microbiomes intestinaux français par le biais d'un appel à contribution nationale.

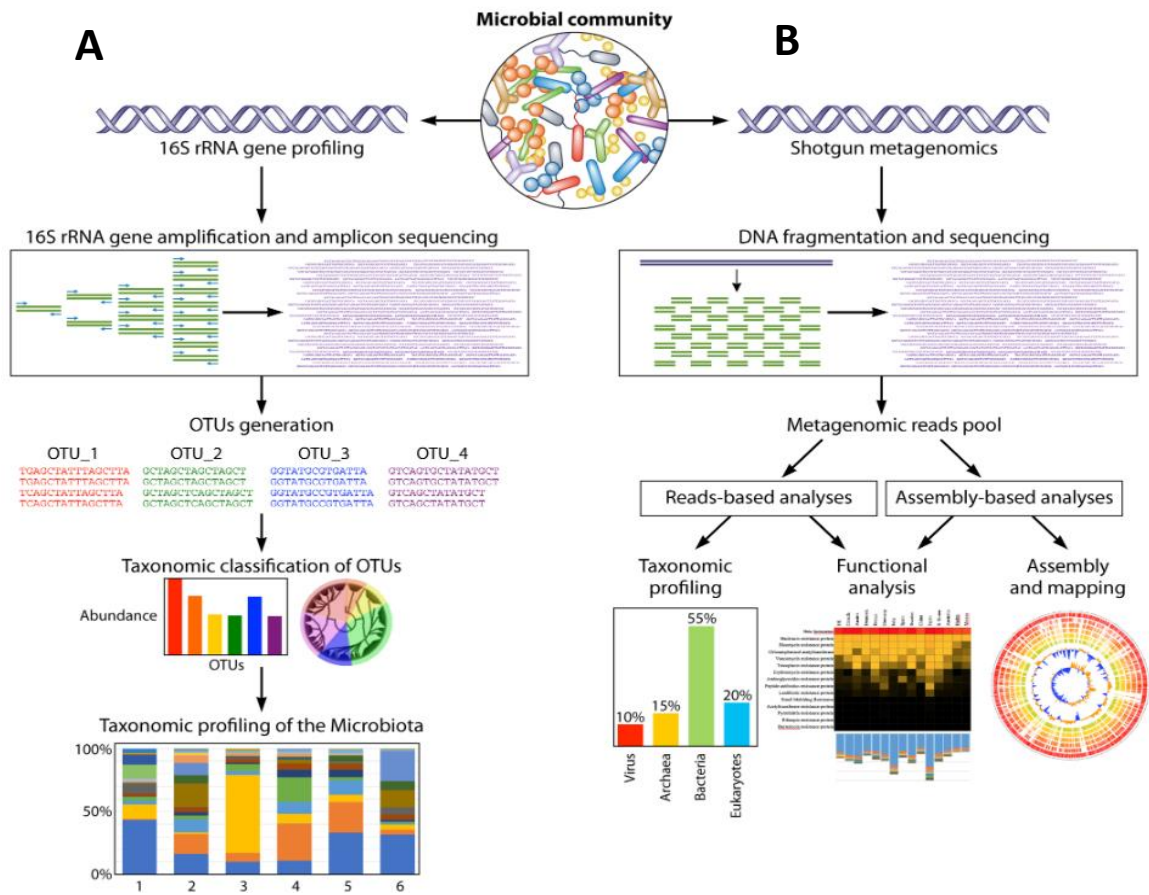


Figure 16 : Vue d'ensemble générale des deux grandes techniques d'analyse génomique du MI : le séquençage de l'ARNr 16S (A) et la métagénomique Shotgun (B). À partir de l'extraction d'ADN d'une communauté microbienne et de son séquençage, une reconstruction des génomes microbiens (A) présents dans l'échantillon ainsi qu'une analyse fonctionnelle des gènes sont possibles (B) (Milani et al., 2017).

c- 16S vs. Shotgun

La technique de séquençage 16S est moins chère et plus simple à manipuler que le séquençage Shotgun, la rendant plus accessible et attractive pour les néophytes. Elle permet aussi de se soustraire de la contamination ADN de l'hôte (ARN 18S chez les eucaryotes) lorsque le Shotgun séquence sans distinction tout l'ADN d'un échantillon. Enfin, le 16S, grâce à son étape d'amplification, possède une plus grande sensibilité aux taxons faiblement présents, qui pourraient passer inaperçus par Shotgun (Wensel et al., 2022 ; Sarangi et al., 2019). Cependant, en 16S, toutes les régions hypervariables ne sont pas séquencées, se concentrant traditionnellement sur la V1 à V3 ou V4-V5 pour réduire les coûts et le temps, ce qui peut conduire des espèces à être sur ou sous-représentées dans un échantillon (Chakravorty et al., 2007). Les points de difficulté du Shotgun résident dans l'immense quantité de données générées par cette technique et la complexité de la reconstruction des génomes via les bases de données. La très grande diversité génétique des différentes communautés bactériennes est un véritable défi, et deux séquences provenant d'un même gène peuvent échouer à se superposer. Le gène passe alors inaperçu (Sharpton, 2014).

Pour résumer, le séquençage 16S est adapté pour une étude à grande échelle des différents taxons présents dans un échantillon, tandis que le séquençage Shotgun est adapté pour une investigation précise des populations bactériennes et de leur potentielle activité sur l'hôte (Sarangi et al., 2019). Les deux méthodes sont couramment utilisées dans la littérature.

Plus récemment, des techniques de séquençage de troisième génération telles que le séquençage en temps réel à molécule unique de Pacific Biosciences (PacBio SMRT seq) ou Oxford Nanopore ont vu le jour, permettant un séquençage de meilleure qualité à moindre coût. Elles sont pressenties pour remplacer le séquençage Illumina, promettant de grandes améliorations dans l'analyse du microbiome (Liu et al., 2021).

3. Méthodes indirectes

Comprendre les relations fonctionnelles et les impacts du MI sur son hôte nécessite une exploration qui va au-delà du contenu génétique microbien. D'autres méthodes d'analyse permettent d'apprécier l'activité des bactéries : Les analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques.

a- Analyse transcriptomique :

En se concentrant sur l'ensemble des ARNm produits par la communauté microbienne, l'analyse transcriptomique éclaire sur l'activité transcriptionnelle des bactéries du MI en observant les gènes exprimés dans un échantillon à un moment donné (Aguilar-Pulido et al., 2016). Cette technique

est basée sur le même principe que la métagénomique et compare les séquences obtenues à différentes bases de données (Bashiardes et al., 2016). Cependant, plusieurs obstacles limitent encore leur application à grande échelle. Premièrement, une grande partie de l'ARN prélevé provient de l'ARN ribosomique, et cette abondance peut masquer considérablement la couverture de l'ARNm (l'objet principal des études transcriptomiques). Deuxièmement, l'ARNm a une demi-vie très courte, ce qui peut compromettre l'intégrité de l'échantillon avant même le séquençage. Enfin, la différenciation entre l'ARN de l'hôte et l'ARN microbien peut être difficile (Aguiar-Pulido et al., 2016), bien que des solutions d'enrichissement existent (Ojala et al., 2023).

b- Analyses protéomiques & métabolomiques

La protéomique et la métabolomique constituent deux approches complémentaires entre elles et avec les autres méthodes d'analyses énoncées précédemment. Elles permettent d'analyser respectivement les protéines et les métabolites bactériens dans un échantillon donné. Ces méthodes sont généralement réalisées en utilisant une combinaison de techniques de chromatographie (chromatographie liquide et chromatographie en phase gazeuse) et de méthodes de détection, telles que la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (Kolmeder et al., 2014 ; Aguiar-Pulido *et al.*, 2016).

La métabolomique est particulièrement prometteuse dans l'analyse des altérations de l'homéostasie du MI avec son hôte. En effet, les variations dans la production de métabolites comme des acides gras à chaîne courte (AGCCs), des vitamines, des acides biliaires et d'autres petites molécules résultant de l'activité métabolique du MI (Chen et al., 2019) traduisent des changements dans l'activité des voies métaboliques, faisant de la métabolomique un outil précieux pour explorer un potentiel déséquilibre entre le MI et son hôte en condition pathologique (dysbiose) (Aguiar-Pulido et al., 2016 ; Vernocchi et al., 2016).

Il est important de noter que l'ensemble des méthodes et approches décrites précédemment sont réalisées pour la grande majorité, sur des échantillons de selles, qui permettent de définir la composition du MI luminal. Quelques études se sont attachées à l'étude du MI adhérent à la paroi intestinale au niveau de la muqueuse et montrent des différences de composition entre ces deux populations de MI (Eckburg et al., 2005), soulignant la diversité des microbiomes au sein du tractus digestif.

4. Indicateurs de la diversité bactérienne

Deux grands paramètres sont couramment utilisés pour évaluer la diversité des espèces bactériennes du MI : l'alpha-diversité et la bêta-diversité.

L'alpha-diversité se rapporte au nombre d'espèces (richesse spécifique) et à la manière dont ces espèces sont distribuées (équitabilité) dans un échantillon. Une alpha-diversité élevée indique un microbiote riche et diversifié, un aspect important pour le MI (Fig. 17A).

La bêta-diversité, d'autre part, fait référence à la diversité biologique entre les écosystèmes ou les échantillons. Elle est utilisée pour comparer la composition des espèces entre différents environnements ou échantillons. Ceci pourrait impliquer de comparer le microbiote d'un individu sain contre un individu dysbiosique, ou l'effet d'un traitement sur la composition des espèces d'un microbiote (Fig.17B) (Liu et al., 2021).

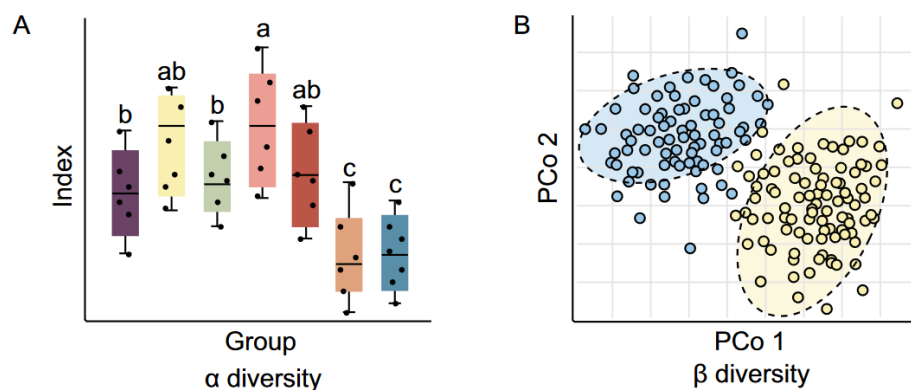


Figure 17 : Représentation des résultats statistiques d'analyse de la diversité microbienne utilisant les indices d' α (A) et de β -diversité (B). L' α -diversité se rapporte au nombre d'espèces (richesse spécifique) et à la manière dont ces espèces sont distribuées (équitabilité) dans un échantillon (A). La β -diversité compare la diversité biologique entre les échantillons (B). PCo1 = « Première composante principale » ; PCo2 = « Deuxième composante principale ». Titres donnés à la composante présentant, respectivement, le plus grand pourcentage de variance dans les données de diversité microbienne (PCo1) et la deuxième plus grande source de variance après PCo1 (PCo2). Tiré de (Liu et al., 2021).

III. Le MI au cours de la vie de l'hôte

1. Une colonisation à la naissance

La première inoculation du microbiote se fait à la naissance, lors de l'accouchement. Avant cela, l'environnement intra-amniotique est considéré comme stérile, et la présence de bactéries est considérée comme pathologique et constitue un danger pour le bon déroulement de la grossesse (Goldenberg et al., 2008). Cependant, ce dogme de stérilité *in utero* a été remis en question par une étude de 2014 révélant la présence d'un microbiome placentaire unique, identifié par des analyses 16S et Shotgun sur le génome entier à partir de 320 échantillons de placenta récupérés en conditions stériles (Aagaard et al., 2014). Suite à cet article, de nombreuses études ont également examiné la présence et la potentielle contribution de ce microbiote *intra utero* à l'inoculation de l'enfant (Collado et al., 2016 ; Al Alam et al., 2020, Theis et al., 2019). Cependant, l'existence d'un tel microbiote reste encore vivement débattue et il y a de forts risques que la présence de cet ADN bactérien soit due à des contaminations (Gil et al., 2020 ; Walter & Hornef, 2021). Très récemment, une méta-analyse s'est penchée sur la question et a conclu que les preuves contemporaines basées sur l'ADN ne soutiennent pas l'existence d'un microbiote placentaire. Les signaux bactériens pourraient provenir d'une contamination environnementale ou de l'ADN bactérien associé à l'accouchement (Panzer et al., 2023).

Ainsi, la première colonisation se fait à la naissance et dépend du mode d'accouchement. L'accouchement par voie basse confèrera au nouveau-né un microbiote prénatal proche du microbiote vaginal et fécal de la mère (riche en *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*), alors que la césarienne confèrera un microbiote proche de celui de la peau (riche en *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*) (Adlerberth & Wold, 2008 ; Putignani et al., 2014). L'intestin du nouveau-né, stérile et rempli de liquide amniotique, est colonisé en premier lieu par des bactéries anaérobies facultatives. Ces bactéries vont, par leur activité métabolique, créer un environnement anaérobie propice à l'installation des *Bacteroidetes*, *Clostridium* et *Bifidobacterium*, des bactéries anaérobies strictes (Rodriguez et al., 2015). Ce proto-microbiote intestinal se caractérise par une faible diversité et une prédominance relative des phyla *Proteobacteria* et *Actinobacteria*. Les différentes expositions néonatales telles que l'allaitement ou la formule infantile, la naissance prématurée, les soins hospitaliers ou l'exposition à des antibiotiques vont avoir un impact sur la composition de ce microbiote primordial (Rodriguez et al., 2015).

Le microbiote se diversifie au fur et à mesure du temps post-natal, avec l'émergence et la prédominance des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes*. À la fin de la première année de vie, les nourrissons possèdent un profil microbien distinct, convergeant vers un microbiote mature, de telle sorte qu'à l'âge de 2 à 5 ans, le microbiote ressemble pleinement à celui d'un adulte en termes de composition et de diversité (Yatsunencko et al., 2012). Par conséquent, les trois premières années de vie représentent une période critique de la mise en place du MI.

2. Le MI au cours de la vie adulte

Au cours de la vie adulte, le microbiote se stabilise (Yatsunencko et al., 2012). La génétique de l'hôte, le style de vie, les différents évènements de la vie (traitement antibiotique ou non), et surtout l'alimentation (Beam et al., 2021) contribuent à forger un MI unique pour chaque individu. Cependant, certaines communautés bactériennes peuvent être dominantes chez certains groupes de personnes, constituant ainsi des « entérotypes » (Arumugam et al., 2011). Trois types d'entérotypes ont été décrits dans la population occidentale en 2011 par Arumugam et ses collaborateurs. L'entérotype 1 présente une prédominance du phylum *Bacteroidetes*. Le type 2 est caractérisé par la présence de *Prevotella*, et enfin, l'entérotype 3 se caractérise par une prédominance des *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011). Plus récemment, un quatrième entérotype, dominé par les *Enterobacteriaceae*, a été observé dans une population asiatique (Liang et al., 2017). Néanmoins, l'existence de ces entérotypes comme éléments clairement séparés et utilisables comme biomarqueurs reste discutée. Ainsi, au lieu de considérer les entérotypes comme des catégories distinctes, cette distribution est plutôt vue comme un continuum allant des types de MI dominés par un phylum à ceux dominés par un autre phylum (Fig.18) (Cheng & Ning, 2019). À ce jour, il reste encore très difficile d'établir des corrélations satisfaisantes entre certains entérotypes et l'état physiologique de l'hôte (Cheng & Ning, 2019).

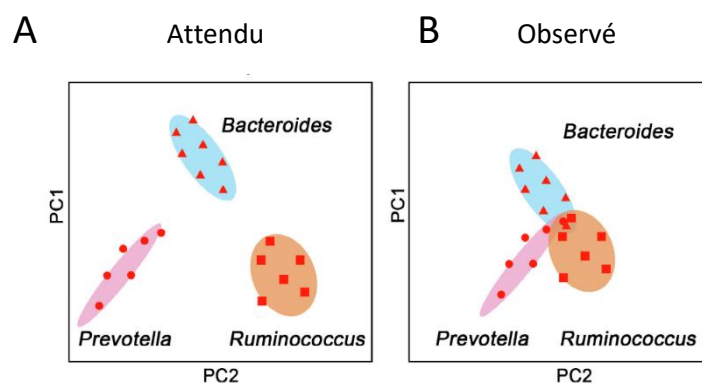


Figure 18 : Les entérotypes sont davantage des entités continues que des catégories distinctes. La simulation d'analyses du microbiote intestinal regroupe les trois entérotypes décrits par Arumugam et al. (2011) entre la théorie (A) et ce qui est observé par des études avec un plus grand nombre d'échantillons (B). Adapté de Cheng & Ning, 2019

Cette immense diversité de MI rend illusoire toute tentative de définir une composition microbienne type pour un « microbiote sain ». Néanmoins, et de façon générale, un microbiote diversifié et riche, c'est-à-dire présentant une abondance d'espèces bactériennes, est associé à une bonne santé métabolique (Fan & Pedersen, 2021). À l'inverse, une diversité microbienne diminuée a été observée chez les personnes souffrant de troubles métaboliques comme l'obésité (Le Chatelier et al., 2013). Cette diversité peut être apportée par un régime alimentaire riche en fibres et pauvre en

graisse. À contrario, un régime pauvre en fibres et riche en graisse (régime occidental) s'associe à une diversité bactérienne appauvrie (De Filippo et al., 2010).

De manière générale, il faut considérer le MI comme un écosystème à part entière qui n'échappe pas aux lois de la sélection naturelle (*survival of the fittest*) et dont les différentes espèces occupent des niches écologiques au sein du tractus digestif. Cela explique la grande sensibilité du MI à l'alimentation. Les bactéries s'adaptent à leur environnement favorisant ou non la survie de certaines espèces utilisant les différents substrats apportés par l'alimentation pour prospérer dans le tractus digestif (Lozupone et al., 2012).

3. De la résilience du MI à la dysbiose

Le microbiote possède des propriétés de résilience qui le rendent stable et relativement « plastique » face aux influences extérieures. La résilience est la capacité du microbiote à assimiler des modifications ponctuelles provenant de son environnement (changement d'alimentation ponctuelle, médication sur une courte période) et à revenir à son état de base stable (Sommer et al., 2017).

Les entérotypes décrits précédemment sont ainsi résistants à un changement d'alimentation de 6 semaines (court terme) (Kang et al., 2016). Cette résilience est néanmoins mise à mal par l'utilisation d'antibiotiques. Un traitement de 5 jours par l'antibiotique ciprofloxacine chez des humains déplete le MI de certaines espèces bactériennes. La déplétion persiste chez certains individus (Dethlefsen & Relman, 2011), indiquant que la capacité de résilience du MI est propre à chaque personne (et donc à chaque microbiote). De la même manière, l'administration de clindamycine (un autre antibiotique à large spectre) pendant 7 jours entraîne une perte de diversité chez les *Bacteroidetes* qui n'est pas restaurée, même 2 ans après le traitement (Jernberg et al., 2007).

Malgré cette résilience, des altérations profondes et durables du MI peuvent avoir lieu. Ces altérations peuvent mener à un déséquilibre entre le MI et la physiologie de l'hôte et mener à des atteintes pathologiques. C'est la **dysbiose**. Cette dysbiose est elle-même sujette à la grande capacité de résilience du MI, rendant très difficile la restauration d'un équilibre physiologique (Fig.19B, C) (Lozupone et al., 2012).

4. Le MI face au vieillissement

Le vieillissement de l'hôte induit des modifications dans le MI. Si les *Firmicutes* sont prédominants chez les adultes, ce sont les *Bacteroidetes* qui dominent chez les personnes âgées (O'Toole & Jeffery, 2015). Ce qui caractérise principalement la composition du MI chez les personnes âgées est une diversité réduite et une moindre abondance d'espèces associée à un bon état physiologique (Fig.19A) (Claesson et al., 2012 ; Mangiola et al., 2018). En 2010, Biagi et collaborateurs

se sont intéressés au MI d'individus centenaires, et ont observé une baisse de l' α -diversité, une augmentation en *Bacilli* et en bactéries pathobiontes (phylum des *Proteobacteria* comprenant de nombreuses espèces commensales qui peuvent être pathologiques sous certaines conditions comme un affaiblissement du système immunitaire) (Biagi et al., 2010).

Des modifications de MI avec l'âge peuvent être la conséquence du changement de style de vie qui accompagne généralement le vieillissement, notamment un changement de régime alimentaire réduisant la diversité alimentaire et les apports en fibres, ainsi que des risques de malnutrition (Claesson et al., 2012). La sédentarité, l'exposition à des environnements hospitaliers et l'augmentation de la médication peuvent aussi contribuer à la modification du MI durant le vieillissement (O'Toole & Jeffery, 2015). Enfin, les modifications de la physiologie digestive chez les personnes âgées, caractérisées par une diminution du temps de transit et des sécrétions digestives, peuvent aussi contribuer au changement dans les populations bactériennes (Mariat et al., 2009).

5. Un MI généré ?

Si la littérature actuelle s'accorde sur l'existence d'une différence entre les sexes dans la composition du MI, ce dimorphisme sexuel apparaît de manière très subtile et difficile à mettre en évidence. Ainsi, chez la souris, des différences de composition microbienne entre mâles et femelles ont été mises en évidence, mais ces différences sont très variables entre les lignées de souris (plus marquées chez les C57BL/6J et C3H/HeJ) et les différentes études et animaleries (Org et al., 2016 ; Kozik et al., 2017 ; Bridgewater et al., 2017).

Chez les humains post-puberté, ces différences sont encore plus difficiles à distinguer. Les premières études menées au début des années 2000 ne montraient pas ou très peu de différences entre les hommes et les femmes (Lay et al., 2005 ; Mueller et al., 2006 ; Li et al., 2008). Avec les avancées des méthodes d'analyse, les femmes semblent présenter une plus grande α -diversité par rapport aux hommes. Cependant, les résultats de chaque étude concernant les différences dans les taxa bactériens sont inconsistants entre elles (Kim et al., 2020 ; McGee & Huttenhower, 2021). L'influence du sexe semble ainsi réelle mais moins prédominante que l'influence du style de vie et de l'alimentation. Toutefois, des études portant sur des groupes d'humains moins occidentalisés, où les rôles de genre sont plus marqués, montrent un dimorphisme microbien plus marqué (McGee & Huttenhower, 2021).

A noter que de nombreuses études ont mis en évidence la sensibilité du MI aux hormones sexuelles (et *vice versa*). Tout d'abord, les différences homme/femme du MI apparaissent chez les individus matures sexuellement, et chez les femmes, la plus grande α -diversité diminue avec le vieillissement (Haro et al., 2016). De plus, les souris femelles et mâles exemptes de germes présentent respectivement des taux plus élevés et plus faibles de testostérone que les souris conventionnelles (Markle et al., 2013). Également, chez les souris mâles, une gonadectomie provoque des différences

dans la composition du MI, qui sont partiellement réversées après l'injection de testostérone (Org et al., 2016).

Dans le contexte de la transplantation de microbiote fécal, ce dimorphisme sexuel dans le MI semble particulièrement impactant. En transplantant le même microbiote fécal d'un individu femelle à un groupe de mâles ou de femelles, les différences se maintiennent en fonction du sexe de l'animal receveur (Yurkovetskiy et al., 2013).

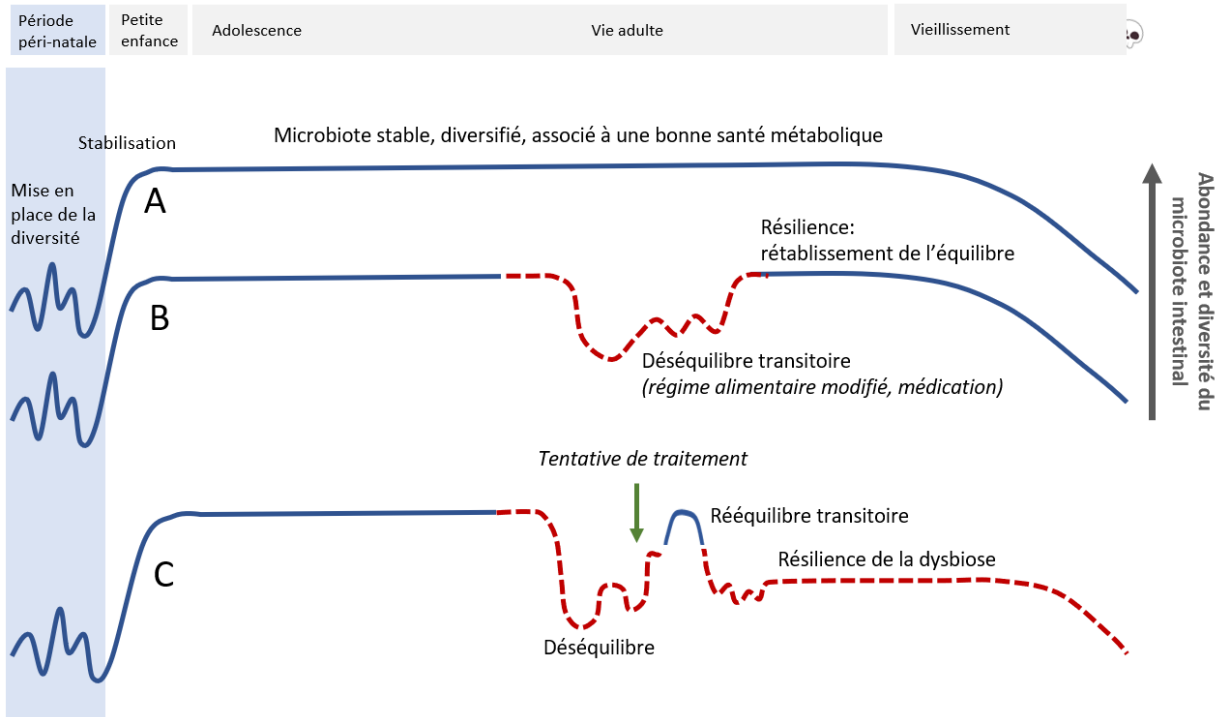


Figure 19 : Modélisation de l'abondance et de la diversité du microbiote intestinal au cours de la vie en condition physiologique (A) ou avec un événement perturbateur à court terme, tel qu'un changement transitoire du régime alimentaire ou une médication diminuant la diversité du microbiote (B). La capacité de résilience du microbiote permet un retour à la normale de la composition microbienne. La dysbiose correspond à un déséquilibre durable du microbiote affectant la physiologie de l'hôte. Cette dysbiose peut aussi faire preuve de résilience et rendre certaines tentatives de rétablissement de l'équilibre difficiles (C). Composition originale à partir de (Le Dréan et al., 2021 ; Sommer et al., 2017).

IV. Rôle du MI dans les grandes fonctions digestives

1. Rôle dans le métabolisme et la digestion

Le MI assure son propre métabolisme en puisant dans nos aliments, et parallèlement, joue un rôle direct dans la digestion et l'assimilation des nutriments au bénéfice de l'hôte. Cette contribution au métabolisme de l'hôte est telle que les besoins énergétiques des modèles animaux dépourvus de microbiote (axéniques ou *germ-free*) sont de 20 à 30 % supérieurs à leurs congénères colonisés, pour un pourcentage de masse grasseuse jusqu'à 50 % moins important (Bläckhed et al., 2005). La plus grande contribution du MI se situe dans la dégradation des fibres alimentaires (lignine, polysaccharides non amidoniques, l'amidon et les oligosaccharides résistant à la digestion par les enzymes digestives de l'hôte) (Adak & Khan, 2019). Les bactéries du MI produisent une armada d'enzymes carbohydrates classées en 4 grandes familles et en centaines de sous-familles (Lombard et al., 2014). Ce sont les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* qui possèdent le plus grand nombre de gènes codant pour les enzymes carbohydrates, utilisant les différents polysaccharides en tant que sources de carbone. Cette digestion des fibres par le MI produit notamment des acides gras à chaîne courte (AGCCs) (qui seront détaillés ultérieurement) et des gaz (Adak & Khan, 2019). Le MI joue également un rôle majeur dans la synthèse des vitamines K et B (Jandhyala, 2015).

Les bactéries du MI sont aussi capables de métaboliser les protéines non digérées par l'hôte (5 à 34 % des protéines) grâce à des protéases et peptidases, agissant de concert avec les protéases de l'hôte, et produisant des peptides et acides aminés, dont certains sont neuroactifs, tels que la tryptamine et la phényléthylamine (Zhai et al., 2023).

Le MI intervient également sur le métabolisme des lipides et le stockage des graisses, en modulant l'activité de la lipoprotéine lipase dans les adipocytes (Jandhyala, 2015). Un transfert de MI provenant de souris obèses chez des souris *germ-free* augmente la lipogenèse et l'adipogenèse de façon bien plus importante que le microbiote provenant de souris à corpulence normale (Turnbaugh et al., 2006).

2. Rôle sur la BEI

Le MI agit sur l'intégrité de la BEI. La composition du MI influe sur l'épaisseur et la pénétrabilité du mucus, composante très importante de la BEI (Jakobsson et al., 2015). Ensuite, affectant plus précisément l'épithélium intestinal, la déplétion du MI chez la souris provoque une augmentation de la perméabilité intestinale, un effet qui est ensuite reversé par la restauration du MI (Vicentini et al., 2021). Par ailleurs, les souris *germ-free*, n'ayant jamais vu le bout d'un flagelle de bactérie, présentent

une diminution de la perméabilité intestinale, associée à une augmentation de l'expression de marqueurs de jonctions serrées (Claudin-1 et Occludin). La transplantation chez ces souris d'un microbiote fécal humain considéré comme sain rétablit ces paramètres aux niveaux des souris élevées de manière conventionnelle (Hayes et al., 2018).

3. Rôle dans la motricité digestive

La déplétion du MI chez des souris provoque une diminution du temps de transit de l'intestin grêle mais une augmentation du temps de transit total. La restauration du MI chez ces souris rétablit le temps de transit (Vicentini et al., 2021). Cette même réduction du transit intestinal, accompagnée d'une réduction de la contractibilité de l'intestin grêle, a été observée chez des rats *germ-free* (Husebye et al., 2001). Le transfert de microbiote fécal provenant de patients souffrant de constipation provoque une diminution du péristaltisme chez les souris receveuses (Cao et al., 2017). Le temps de transit impacte également la composition du microbiote (Procházková et al., 2023). Récemment, une étude a mis en évidence le rôle du facteur de transcription Ahr (*aryl hydrocarbon receptor*), exprimé par les neurones entériques en présence du MI, dans la capacité des neurones entériques à « surveiller » le contenu microbien luminal et à ajuster le péristaltisme en conséquence (Obata et al., 2020).

V. Impact du MI sur le SNE

1. Sur le développement et le remodelage du SNE

Les effets du MI sur le développement et la fonction du SNE ont été illustrés, là aussi, par l'utilisation de souris *germ-free*. Ces souris présentent une diminution du nombre de neurones myentériques dans le jéjunum et l'iléon, accompagnée d'une augmentation du nombre de neurones nitrénergiques dans ces mêmes régions (Collins et al., 2014). De façon intéressante, l'observation de différences dans la composition du microbiote fécal chez des modèles génétiques murins ou de poissons-zèbres d'aganglionose suggère que le SNE peut aussi influencer la mise en place du MI (Ward et al., 2012 ; Rolig et al., 2017). Cependant, il reste à déterminer si ces anomalies représentent des effets directs du SNE sur le microbiote ou si elles ne sont que les conséquences d'un péristaltisme altéré (Margolis et al., 2021).

La déplétion du MI chez des souris provoque une perte du nombre de neurones entériques et de CGE dans les plexus myentériques et sous-muqueux, dans l'iléon et le colon proximal. De façon impressionnante, la restauration du microbiote chez ces souris stimule la neurogenèse et provoque la restauration du nombre de neurones entériques et de CGE (Vicentini et al., 2021), démontrant simultanément la puissante capacité du microbiote dans la plasticité du SNE.

2. Sur la communication neuronale entérique

En plus d'une capacité de remodelage sur le SNE, de nombreux articles ont montré un impact du MI sur des éléments de la connectivité et de la communication neuronale. Ainsi, les IPANs myentériques des souris *germ-free* présentent un seuil d'excitabilité diminué (McVey Neufeld et al., 2013), ainsi qu'une diminution, dans les neurones du jéjunum, de la calbindine, une protéine de liaison au calcium importante dans la réponse calcique neuronale (McVey Neufeld et al., 2015). De façon plus précise, des rats supplémentés avec le probiotique *Lactobacillus reuteri* présentent une inhibition des canaux potassiques calcium-dépendants dans les neurones sensoriels AH du colon, ayant pour conséquence un abaissement du seuil d'excitabilité et une excitabilité neuronale exacerbée (Kunze et al., 2009).

La plasticité synaptique, qui pour rappel est très difficile à mettre en évidence dans le SNE, pourrait également être impactée par le MI. En particulier, le MI pourrait, par ses métabolites, induire un remodelage des synapses entériques. En effet, une récente étude (Gonzales et al., 2021) montre que le transfert de surnageant fécal (contenant uniquement des métabolites du microbiote fécal dépourvu de bactéries) provenant d'individus atteints d'autisme induit une diminution de l'expression de la protéine pré-synaptique synapsin 1 dans le colon proximal des souris.

VI. Les médiateurs du MI

Si le MI est capable d'interactions directes avec les cellules de l'hôte, les interactions indirectes via les métabolites bactériens libérés dans la lumière intestinale et/ou la circulation systémique constituent la voie de communication la plus étudiée et ont été mises en évidence dans de nombreuses actions du MI sur les fonctions digestives et le SNE. Les métabolites bactériens présentent une très grande diversité, dont une revue exhaustive dans ce manuscrit ne serait pas chose aisée. Ainsi, ne seront abordés dans ce chapitre que deux grandes classes de métabolites connues pour leur rôle dans la physiologie digestive : Les acides gras à chaîne courtes (AGCCs) et les acides biliaires secondaires.

1. Les acides gras à chaînes courtes (AGCC)

a- Présentation

Les AGCCs sont des acides gras saturés produits par la fermentation des fibres alimentaires par les bactéries anaérobies du tube digestif, principalement dans le côlon. Les AGCCs les plus abondamment retrouvés (95 % des AGCCs) sont l'acétate, le propionate et le butyrate (Geng et al., 2022). L'acétate et le propionate sont produits majoritairement par le phylum des *Bacteroidetes*, tandis que le butyrate est principalement produit par les *Firmicutes* (den Besten et al., 2013). Les

AGCCs peuvent diffuser ou être transportés dans les cellules de l'hôte via des transporteurs présents au niveau apical et basolatéral de l'épithélium (Sivaprakasam et al., 2017). Dans le gros intestin, 95 % des AGCCs sont réabsorbés, tandis que les 5 % restants sont excrétés dans les fèces (den Besten et al., 2013). Un des transporteurs des AGCCs, le MCT2, se trouve être exprimé par les neurones entériques (Soret et al., 2010). Les AGCCs peuvent également activer des récepteurs couplés aux protéines G, comme les récepteurs Ffar2 et Ffar3 (*Free fatty-acid receptor*) (Brown et al., 2003). Dans le SNE, le récepteur Ffar3 est exprimé par les neurones entériques de type nitrergique et de type cholinergique (Geng et al., 2022).

b- Actions principales

Premièrement, les AGCCs constituent une source d'énergie pour l'hôte, fournissant environ 10 % des besoins énergétiques journaliers de l'hôte (Bergman, 1990). Deuxièmement, les AGCCs ont montré des actions sur la motricité digestive. Ainsi, l'acétate et le butyrate accélèrent le transit intestinal *in vivo*, et le propionate et le butyrate augmentent la réponse contractile *ex vivo*, des actions impliquant le SNE (Richardson et al., 1991 ; Yajima, 1985). Le propionate, quant à lui, est capable d'augmenter la fréquence des contractions dans le colon distal via une action sur les motoneurones cholinergiques (Mitsui et al., 2005). Les AGCCs sont aussi capables de remodeler le SNE en modifiant les proportions neurochimiques des neurones entériques. Ainsi, chez le rat, la supplémentation en butyrate augmente la proportion de neurones cholinergiques dans le plexus myentérique, associée à une augmentation de la motricité colique et de la réponse contractile (Soret et al., 2010). Cette action est rattachée à la capacité des AGCCs à inhiber les histones désacétylases (HDAC) (Cleophas et al., 2016).

Enfin, les AGCCs ont une action sur l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale. En effet, les souris *germ-free* ou traitées aux antibiotiques présentent une réduction de la prolifération et du renouvellement des cellules épithéliales intestinales qui peut être restaurée par la supplémentation d'une combinaison d'acétate, de propionate et de butyrate (Park et al., 2016). À l'inverse, l'application de butyrate sur les cellules souches intestinales (localisées dans les cryptes) inhibe leur prolifération et entrave les mécanismes de réparation de la BEI (Kaiko et al., 2016). De façon intéressante, les AGCCs semblent avoir des effets spécifiques selon le type d'AGCCs et selon le type de cellules ciblées, et l'existence d'un gradient intraluminal (dans lequel les cellules souches au fond des cryptes sont faiblement exposées aux AGCCs) semble important dans le maintien de l'homéostasie digestive. Enfin, les AGCCs sont capables d'augmenter la production de mucus (MUC2) par les cellules caliciformes (Burger-van Paasen et al., 2009).

2. Les acides biliaires secondaires

a- Présentation

Les acides biliaires (AB) secondaires proviennent de la métabolisation des AB primaires par les bactéries du MI.

Les AB primaires proviennent de la dégradation du cholestérol par les enzymes du foie, formant l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA) (Russell, 2009). Deux voies de synthèse existent faisant intervenir environ 17 enzymes. La voie classique (ou neutre) est initiée par l'enzyme CYP7A1 et constitue la voie majoritaire dans le foie pour la synthèse des AB primaires. La voie alternative (ou acide) est la voie minoritaire, initiée par l'enzyme CYP27A1, elle est à l'origine de moins de 10 % des AB retrouvés dans l'intestin humain (contre 50 % chez les rongeurs). On retrouve également cette voie alternative dans le cerveau, capable de synthétiser en faible quantité des AB primaires, et donc la synthèse est initiée par l'enzyme CYP46A1 (Chiang & Ferrell, 2019). Après une prise alimentaire, les cellules entéroendocrines du duodénum relâchent l'hormone cholécystokinine (cellule I) qui déclenche le relargage des AB primaires de la vésicule biliaire où ils sont stockés, dans la lumière intestinale (Fig.20) (Alberto González-Regueiro et al., 2017).

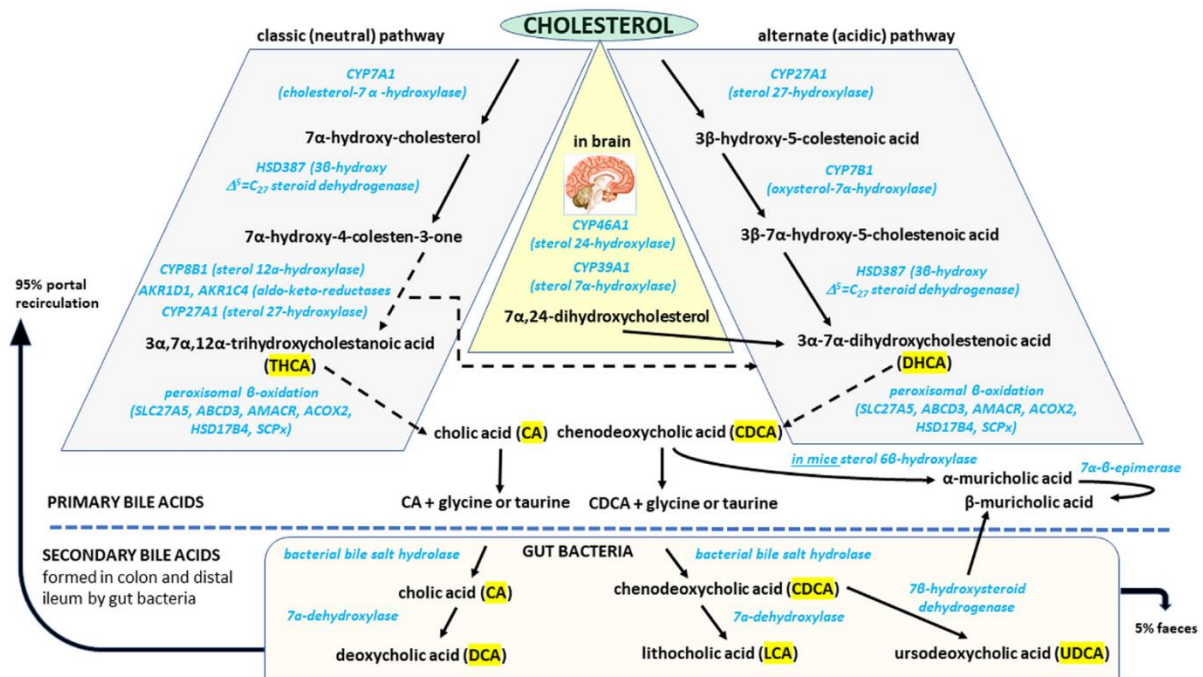


Figure 20 : Les sels biliaires primaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol par la voie classique (CYP7A1) ou les voies accessoires (CYP27A1 dans le foie et CYP46A1 dans le cerveau). Les sels biliaires primaires sont l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA). Une fois libérés dans l'intestin, les bactéries du microbiote intestinal déconjuguent et métabolisent les sels biliaires primaires en sels biliaires secondaires dont les majoritaires sont l'acide désoxycholique (DCA), l'acide lithocholique (LCA) et l'acide ursodéoxycholique (UDCA) (Hurley et al., 2022)

Dans l'iléon et majoritairement dans le colon, les AB primaires rencontrent les bactéries du MI et sont hydrolysés par les enzymes bactériennes (enzymes d'hydrolase des sels biliaires). Ces enzymes sont fortement actives chez les genres *Clostridium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, et *Lactobacillus* (Gram⁺) ainsi que chez les *Bacteroidetes* (Gram⁻). Les AB secondaires majeurs sont l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA). D'autres AB secondaires plus minoritaires sont aussi synthétisés, tels que l'acide ursodéoxycholique (UDCA) et l'acide hyodéoxycholique (HDCA). Les AB secondaires, comme les primaires, peuvent être conjugués à des groupements taurine ou glycine (tauro-conjugués ou glycoconjugués) (Hurley et al., 2022). Ainsi, chez les humains, les AB sont composés d'environ 40 % de CA, 40 % de CDCA et 20 % de DCA et sont globalement hydrophobes (Hurley et al., 2022). La majorité des AB primaires et secondaires sera réabsorbée au niveau de l'iléon (95 %), le reste sera excrété par les fèces (Fig.20) (Chiang & Ferrell, 2019).

Les AB secondaires agissent sur la physiologie de l'hôte via des récepteurs aux AB exprimés dans le système digestif, mais aussi dans le cerveau. Le premier récepteur aux AB, et le mieux caractérisé à ce jour, est le récepteur couplé à une protéine G, TGR5 (*Takeda G protein-coupled receptors 5*, aussi appelé GPBAR-1 ou GPBA). TGR5 est exprimé tout au long du tube digestif (Maruyama et al., 2002), ainsi que par les neurones centraux et les astrocytes (Keitel et al., 2010). TGR5 est sensible au LCA, DCA, CDCA et UDCA, avec une très forte affinité pour le LCA et le DCA (Chiang et Ferrell, 2019). Son activation recrute les voies moléculaires cAMP et protéine Kinase A (PKA), conduisant à la phosphorylation de CREB (*cAMP response element-binding protein*) et à la régulation des gènes cibles. Le second récepteur est le récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X Receptor), capable de réguler l'expression de gènes cibles. Il est exprimé dans le système digestif (Makishima et al., 1999), ainsi que dans le cerveau, par les neurones centraux (McMillin et al., 2016). FXR est affiné pour plusieurs AB différents (CDCA > DCA = LCA > CA), avec une préférence pour les formes conjuguées (Martinot et al., 2017). D'autres récepteurs aux AB ont aussi été identifiés, tels que le récepteur pregnane X (PXR), le récepteur à la vitamine D (VDR) et le sphingosine-1-phosphate récepteur 2 (S1PR2) (Chiang et Ferrell, 2019)

b- Actions principales

Sur le SNE : L'action des AB secondaires sur les neurones entériques et le SNE n'a pas encore été clairement investiguée. Cependant, le récepteur TGR5 est exprimé dans le plexus myentérique, principalement par les neurones nitrénergiques, et dans le plexus sous-muqueux, principalement par les neurones cholinergiques. TGR5 est aussi exprimé par les IPANs et l'activation de ce récepteur impacte la motricité digestive, indiquant une potentielle action directe des AB secondaires sur le SNE (Poole et al., 2010).

Sur la motricité digestive : L'étude de Poole et collaborateurs a également montré que l'activation de TGR5 par un agoniste induit un ralentissement du temps de transit associé à une diminution de la motricité intestinale (Poole et al., 2010). Cette inhibition a été montrée, par la suite,

induite par la libération de NO, et les souris KO pour TGR5 sont insensibles à ce ralentissement de transit intestinal suite à une stimulation par le DCA (par rapport aux contrôles WT stimulés au DCA) (Alemi et al., 2013). De plus, le DCA augmente de façon localisée la motricité colique (Shiff et al., 1982). Or, de manière intéressante, la présence de TGR5 sur les cellules entérochromaffines du colon (mais pas de l'intestin grêle) suggère que les AB secondaires pourraient directement agir sur la libération de 5-HT dans le colon permettant une régulation de la motricité colique (Lund et al., 2018).

Sur la perméabilité digestive : Le traitement avec une forte dose de DCA (4 mM) augmente la perméabilité colique chez le rat. Cet effet semble impliquer le SNE et particulièrement la voie nitreurgique car l'inhibition de la synthèse de NO inhibait les effets du DCA sur la perméabilité (Sun et al., 2004). Les AB secondaires sont aussi des régulateurs de l'expression de protéines de jonctions serrées, impliquées dans la perméabilité intestinale. Ces effets ont été montrés dans des modèles animaux *in vivo*, chez lesquels l'ingestion d'un agoniste de FXR diminue la perméabilité intestinale et augmente l'expression des protéines claudine-1 et occludine (Verbeke et al., 2015). De plus, les souris KO pour le récepteur TGR5 présentent une augmentation de la perméabilité intestinale, associée à une augmentation et une altération de la distribution de ZO-1 (Cipriani et al., 2011).

Sur la prolifération des cellules épithéliales du colon : Dans un autre registre, les AB secondaires, et plus précisément le DCA (à 5-50 μ M), ont été impliqués dans la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses de l'épithélium intestinal colique et pourraient contribuer au développement de cancers colorectaux (Pai et al., 2004 ; Zeng et al., 2019). Cependant, les AB secondaires ont aussi été impliqués dans des effets antimitotiques et pro-apoptotiques suite à la libération de ROS, indiquant une réalité complexe et dépendante du contexte (Zeng et al., 2019).

Il est important de noter que les AB secondaires ont été rapportés comme ayant des effets dose-dépendants. En effet, de nombreuses études utilisent des concentrations élevées d'AB secondaires, mettant en évidence des effets délétères sur la BEI et les fonctions digestives. En revanche, des effets totalement opposés sont observés lors de l'utilisation de doses plus faibles se rapprochant des concentrations physiologiques (Barrasa et al., 2013).

VII. Impact du MI sur le cerveau

1. Impact sur le comportement

Les souris *germ-free* offrent une fois de plus un très bon modèle pour mesurer l'impact du MI sur le comportement. En effet, de nombreuses altérations cognitives et comportementales ont été rapportées chez ces souris, révélant un impact du MI sur le développement et le fonctionnement du SNC. Ainsi, les souris *germ-free* présentent une réduction de l'anxiété évaluée dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Neufeld et al., 2011 ; Heijtz et al., 2011). Ces souris *germ-free* présentent également une hyperactivité motrice mesurée lors du test de l'open-field ainsi que des atteintes cognitives avec

une altération de la mémoire (Gareau et al., 2009). Dans une étude de 2014, Desbonnet et collaborateurs mettent en évidence chez les souris *germ-free* une diminution de la sociabilité et de la préférence pour la nouveauté sociale, ainsi qu'une exacerbation des comportements stéréotypés au travers d'une augmentation du temps de toilettage. Deux traits qui se rapprochent des symptômes des TSA. Une colonisation microbienne post-sevrage chez ces souris rétablit une sociabilité et un temps de toilettage contrôlé mais échoue à rétablir l'attraction pour la nouveauté sociale, indiquant que ce comportement est établi de façon permanente chez ces souris (Desbonnet et al., 2014).

2. Impact sur la plasticité du SNC

Les altérations comportementales des souris *germ-free* s'accompagnent de modifications moléculaires qui affectent la communication entre les neurones centraux. En effet, l'absence de MI dans ce modèle murin est associée à une altération de la voie des endocannabinoïdes (Manca et al., 2020), à une modification, dans l'hippocampe, de l'expression du BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), un facteur neurotrophique impliqué dans la plasticité du réseau neuronal, ainsi qu'à une diminution, dans l'amygdale centrale, de l'expression de la sous-unité NR2B du récepteur au glutamate NMDA (Neufeld et al., 2011). Or ces deux régions cérébrales sont impliquées dans les processus de mémorisation (Glinert et al., 2022). De même, les souris *germ-free* présentent une augmentation de l'expression des protéines synaptiques synaptophysine et PSD95 dans le striatum, ce qui pourrait indiquer une structuration synaptique différente sous-jacente aux modifications comportementales observées (Heijtz et al., 2011).

Enfin, le transfert de microbiote fécal provenant de souris âgées chez de jeunes souris *germ-free* conduit à une altération de l'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique et la neurotransmission dans l'hippocampe (analyse des protéines *up* et *down* régulées par *Ingenuity Pathway Analysis*), en lien avec un déficit de mémoire spatiale chez les jeunes souris receveuses (D'Amato et al., 2020).

À la vue de l'impact du MI sur le comportement et les fonctions digestives, la place du MI dans l'autisme, dont les atteintes digestives sont si prédominantes, constitue un champ de la recherche en effervescence et un véritable défi dans la compréhension de la physiopathologie de l'autisme.

Partie 2 : Le microbiote intestinal dans l'autisme

I. Un microbiote TSA ?

1. Composition microbienne du MI des individus avec TSA

La littérature scientifique, et notamment les études par méta-analyse, s'accorde sur l'existence d'une composition différente du MI chez les individus avec TSA comparée aux contrôles neurotypiques (Bezawada et al., 2020 ; Iglesias-Vázquez et al., 2020 ; West et al., 2022 ; Kortenienmi et al., 2023). Cependant, ces modifications du MI observées sont extrêmement diverses et différentes entre les études. Quelques grandes modifications ressortent malgré la disparité de la littérature. Ainsi, le microbiote des enfants TSA présente en général une altération du ratio Firmicutes/Bacteroidetes ainsi qu'une plus grande abondance de *Clostridium* (Oh & Cheon, 2020 ; Ma et al., 2019) et de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Sutterella* comparé aux enfants neurotypiques (Kortenienmi et al., 2023). Il est important de noter que la très grande majorité des études analysant le microbiote intestinal TSA sont réalisées sur des enfants et adolescents (<18 ans), mais que ces différences microbiennes sont aussi retrouvées chez les individus TSA adultes (Gonzales et al., 2021 ; Zhang et al., 2021), même si les études s'intéressant à des cohortes adultes restent encore trop rares.

Concernant la diversité du MI, si l'altération de la β -diversité est assez robustement observée dans les différentes études (reflétant la variabilité globale entre les communautés bactériennes TSA et contrôle), les résultats concernant l' α -diversité ne sont pas aussi homogènes. Certaines études montrent une augmentation de l' α -diversité chez les enfants TSA (Tomova et al., 2020 ; Zou et al., 2020), d'autres montrent, au contraire, une diminution (Kang et al., 2018 ; Ma et al., 2019 ; Carissimi et al., 2019), et d'autres encore ne montrent pas de différence significative entre les groupes (Zhang et al., 2018 ; Plaza-Díaz et al., 2019). Quelques exemples d'études et descriptions des différents phyla retrouvés modifiés dans le microbiote fécal d'individus avec TSA sont présentés dans le tableau 3.

Ces grandes disparités dans l' α -diversité microbienne chez les patients TSA pourraient être liées aux très nombreuses différences, entre les études, dans l'âge des individus concernés (jeunes enfants ou adolescents), leur sexe (une très grande sur-représentation des garçons), leur régime alimentaire (même si la majorité des études prennent le soin d'exclure les individus au régime alimentaire trop restreint), la sévérité des symptômes autistiques, la prise d'antibiotiques (la grande majorité des études prennent en compte ce paramètre et imposent une absence de traitement 1 à 3 mois avant l'étude), ou encore les régions géographiques d'où proviennent les études (Europe occidentale, Amérique du Nord, Afrique, Asie) qui influencent le MI des cohortes ainsi que les tailles, souvent restreintes, des cohortes. Enfin, les différentes méthodes d'analyses utilisées par les différentes équipes influencent aussi sur les résultats (West et al., 2022 ; Kortenienmi et al., 2023).

	Reference
<i>Clostridium and Ruminococcus spp.</i> ↑	Finegold <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacteroidetes, Proteobacteria, Alkaliflexus, Desulfovibrio, Acetanaerobacterium, Bacteroides, Parabacteroides, Desulfovibrio spp.</i> ↑ <i>Actinobacteria, Turicibacter Clostridium, Firmicutes, Weissella, Helcococcus, Alkaliphilus, Anaerofilum, Pseudoramibacter, Ruminococcus, Streptococcus, Anaerovorax, Dialister, Lactococcus</i> ↓	Finegold <i>et al.</i> , 2010
<i>Firmicutes</i> ↓, <i>Proteobacteria</i> ↓, <i>Verrucomicrobia</i> ↓ <i>Bacteroidetes/Firmicutes</i> ↑, <i>Dialister</i> ↓ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Bacteroides, Megamonas, Escherichia/Shigella, Lachnospiraceae incertae sedis</i> ↑ <i>Clostridium XIVa, Eisenbergiella, Clostridium IV, Flavonifractor, Haemophilus, Akkermansia</i> ↓	Zou <i>et al.</i> , 2020
<i>Lachnospiraceae, Clostridiales, Dorea, Erysipelotrichaceae, Collinsella, Lachnoclostridium</i> ↑ <i>Bacteroides, Faecalibacterium, Parasutterella, Paraprevotella</i> ↓	Ding <i>et al.</i> , 2020
<i>Firmicuteses, Megamonas, Proteobacteria, Actinobacteria, Dialister, Escherichia-Shigella, Bifidobacterium</i> ↑ <i>Bacteroidetes</i> ↓	Williams <i>et al.</i> , 2011
<i>Clostridium, Dialister, Coprobacillus</i> ↑ <i>Faecalibacterium</i> ↓	Wan <i>et al.</i> , 2022

Tableau 3 : Diversité des différentes modifications du MI chez les enfants atteints de TSA comparé à des contrôles neurotypiques, retrouvée dans la littérature. Ces grandes disparités entre les études peuvent être dues aux différences d'âge, de sexe, de régime alimentaire, de nationalité et de méthodes d'analyse entre les études, auxquelles s'ajoute la grande diversité intrinsèque des individus diagnostiqués sur le spectre autistique. Tiré de (Dinan & Dinan, 2022)

Récemment, Yap et collaborateurs (Yap *et al.*, 2021) ont bousculé quelque peu le monde du MI dans les TSA. Leur étude, analysant le microbiote fécal par métagénomique, conclut à une influence principale du régime alimentaire (et notamment une influence de la faible diversité alimentaire chez les individus avec TSA) sur les différences microbiennes observées entre TSA et contrôles, tandis que le diagnostic de TSA exercerait une influence mineure. Cette étude, qui est à ce jour la seule en son genre, nuance la relation de cause à effet entre l'autisme et la dysbiose, sans pour autant affaiblir l'influence du MI sur certains paramètres physiopathologiques des TSA abordés dans cette partie. Ces résultats montrent que plutôt que de se concentrer uniquement sur les différences microbiennes, il est nécessaire d'étendre les études sur le lien entre l'alimentation, le microbiote intestinal ainsi que sur les voies métaboliques fonctionnelles potentiellement altérées dans l'autisme (Özcan & Hsiao, 2022; Kortenienmi *et al.*, 2023).

2. MI des modèles animaux des TSA

Les modèles animaux génétiques ou environnementaux des TSA présentent également des différences dans la composition de leur microbiote intestinal fécal. Ces modèles, qui permettent un contrôle précis de l'alimentation, constituent des outils précieux pour explorer le rôle du microbiote intestinal dans les symptômes de l'autisme. Il est important de noter que cette forme d'exploration est assez récente, et l'étude du MI dans les modèles TSA est en pleine construction, avec encore assez peu d'études, ne couvrant pas tous les modèles d'autisme.

Une diminution de l' α -diversité a été observée chez les souris KO pour *Shank3* (Tabouy et al., 2018), les souris BTBR (Golubeva et al., 2017; Liu et al., 2022; Newell et al., 2016), les souris modèles d'activation immunitaire maternelle (MIA) (Chen et al., 2020; Kang et al., 2017) et de régime maternel riche en graisse (MHFD) (Xie et al., 2018). Une diminution de l' α -diversité a également été observée chez les souris et les rats exposés *in-utero* à l'acide valproïque (VPA) (Kang et al., 2017 ; Liu et al., 2018). Cependant, d'autres études n'observent pas de différences dans l' α -diversité chez ces mêmes modèles : souris BTBR (Coretti et al., 2017), souris MIA (Hsiao et al., 2013), souris VPA (de Theije et al., 2014) et rats VPA (Kong et al., 2021). De même, aucune altération de l' α -diversité n'a été reportée chez les souris *Shank3B* KO (Sgritta et al., 2019), Neurologine3 (NL3^{R451C}) (Hosie et al., 2019), *Fmr1* KO2 (Altimiras et al., 2021).

Les souris invalidées pour le gène *CHD8* (*Chd8*^{-/-}) présentent à l'âge adulte une différence dans la β -diversité par rapport aux contrôles *Chd8*^{+/+} associée à une diminution des *Bacteroidetes*, et plus précisément des espèces *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides acidifaciens* et *Bacteroides vulgatus* (Yu et al., 2022). Une diminution de la β -diversité a aussi été observée chez les rats et souris VPA (Liu et al., 2018) (Kang et al., 2017; Sgritta et al., 2019), MHFD (Buffington et al., 2016; Xie et al., 2018), MIA (Chen et al., 2020; Hsiao et al., 2013), BTBR (Coretti et al., 2017; Golubeva et al., 2017; Liu et al., 2022; Newell et al., 2016), *Shank3* KO (Tabouy et al., 2018), NL3^{R451C} (Hosie et al., 2019) et *Fmr1* KO2 (Altimiras et al., 2021).

Comme pour l'humain, l'analyse du MI chez ces différents modèles animaux n'échappe pas à la diversité et à l'inconsistance des résultats en fonction des études, avec l'existence de résultats différents au sein du même modèle. La revue récente de Tartaglione et collaborateurs offre un très grand travail de compilation des différents phyla et espèces modifiés dans les différents modèles murins des TSA (Tableau 4) (Tartaglione et al., 2023). D'après la littérature, les auteurs rapportent une tendance à l'augmentation de l'abondance des *Bacteroidetes* et une diminution des *Firmicutes* chez les différents modèles (augmentant le ratio *Bacteroidetes/Firmicutes*), ainsi qu'une diminution de *Limosilactobacillus reuteri* (anciennement appelé *Lactobacillus reuteri*) (*L. reuteri*) (Tartaglione et al., 2023).

	Genetic models						Idiopathic model						Environmental models										
	Shank3 KO			NI3	Fm1 KO2	Mecq2	BITR						MIA			VPA			MHFD				
References (see table legend)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	
Light/Dark cycle	N.A.	N	N.A.	N	N	N	N	N	N	N	N	N.A.	N.A.	N.A.	N	R	N	N.A.	N.A.	N	N	N	
Age (weeks)	8	10	10	5-9	N.A.	10-11	7	N.A.	N.A.	7-10	8	8	3-4	10	15-20	4-16	4	3-4-5	8	10	4-8	7-12	
Phyla																							
<i>Actinobacteria</i>	=	↑	↑	= ^{5,9}	↓	=↓		=	~↑	↓	↓	= ³		↑		= ^{4,16}	=	=	↑	=	= ^{4,8}	=	
<i>Bacteroidetes</i>		=	=	= ^{5,9}	↑	↑↓	↑	=	↑	=			~↓ ³	↑		↑↓ ⁴	↑↓	~↓	↑	↑	= ^{4,8}	=	
<i>Chloroflexi</i>		=																					
<i>Cyanobacteria</i>		=		= ^{5,9}	↑	=		↓	↓	=		= ³											
<i>Deferribacteres</i>		=	↑		=			=↑	=	=		= ³	=			= ^{4,16}	=	=		=			
<i>Firmicutes</i>		=	↑	= ⁵⁻⁹	↑	↑↓	↓	=	↓	=		~↑ ³	↓			~↓ ⁴	↑↑	~↑		↓	= ^{4,8}	=	
<i>Proteobacteria</i>		=	↓	= ^{5,9}	↓	=	↑	↑	↓	=		= ³	=			= ^{4,16}	=	=		↓	↑ ^{4,8}	=	
<i>Synergistetes</i>					=							= ³											
<i>Tenericutes</i>		=	↑	= ^{5,9}	↓	=↑		=	=	=		= ³				↑↓ ⁴	=	=		=	= ^{4,8}	=	
<i>TM7 (also known as Candidatus Saccharibacteria)</i>		=						↓	=				=		↑								
<i>Verrucomicrobia</i>		=	↓		↑	↓		=	↑	=		= ³	=			↑↓ ⁴		=		=			

Tableau 4 : Modification des différents phyla microbiens du MI chez les modèles animaux des TSA. Une certaine variabilité des résultats en fonctions des études et des modèles TSA est observable. N.A. (non disponible), N normal, R reverse ; ↑ augmentation de l'abondance, ↓ diminution de l'abondance ou = pas de différences ; ~ tendance vers une signification statistique ; la couleur rose fait référence aux femelles, la couleur bleue fait référence aux mâles, le noir fait référence aux deux sexes non signalés ou non pris en compte dans les analyses ; chiffres en exposant : âge des animaux en semaines. Références : (1) Tabouy et al. (2018); (2) Sgritta et al. (2019); (3) Sauer et al. (2019); (4) Hosie et al. (2019); (5) Altimiras et al. (2021); (6) Neier et al. (2021); (7) Newell et al. (2016); (8) Coretti et al. (2017); (9) Golubeva et al. (2017); (10) Sgritta et al. (2019); (11) Liu et al. (2022); (12) Hsiao et al. (2013); (13) Lim et al., 2017; (14) Chen et al. (2020); (15) Saunders et al., 2020; (16) Tartaglione et al. (2022); (17) de Theije et al. (2014); (18) Lim et al., 2017; (19) Liu et al. (2018); (20) Sgritta et al., 2019 ; (21) Kong et al. (2021); (22) Buffington et al. (2016). Tableau tiré de (Tartaglione et al., 2023)

Chez ces modèles animaux de TSA, le sexe est également à l'origine de différences dans la composition du MI, et toutes les études qui prennent en compte ce paramètre observent des différences de composition bactérienne entre les individus mâles et femelles. Par exemple, dans le modèle de souris VPA, les mâles présentent une augmentation de l'abondance des genres *Alistipes*, *Enterorhabdus*, *Mollicutes*, *Lactobacillales* et *Erysipelotrichalis* par rapport aux femelles VPA (de Theije et al., 2014) (Tableau 4).

L'étude du MI des modèles poisson-zèbre de l'autisme n'a pas encore été explorée (à la date de l'écriture de ce manuscrit), mais elle représente un potentiel considérable. Les poissons-zèbres possèdent un MI riche en *Proteobacteria* et *Fusobacteria*, et son analyse est tout à fait possible avec les mêmes technologies que pour le microbiote fécal des mammifères (Andersen-Civil et al., 2023). De plus, les poissons-zèbres peuvent être élevés dans des conditions *germ-free* et n'ont pas besoin de se nourrir avant huit jours post-fécondation (Hernandez et al., 2018), ce qui en fait un modèle robuste et prometteur pour l'exploration de l'axe intestin-cerveau dans les TSA ou dans d'autres affections neurologiques.

II. Les métabolites modifiés dans l'autisme

La modification de la composition du MI dans l'autisme implique de potentielles altérations des métabolites bactériens. Ces métabolites peuvent constituer un instrument par lequel le MI participe aux troubles comportementaux et digestifs de l'autisme. Durant ces dernières années, un gros effort en analyse métabolomique a été mené pour essayer de mettre en lumière des biomarqueurs métaboliques dans les TSA.

1. Les AGCCs

Dans leur étude de 2019, Liu et collaborateurs ont analysé la relation entre le microbiote intestinal et les AGCCs fécaux chez les enfants atteints de TSA ou neurotypiques. Leurs résultats montrent une altération des AGCCs fécaux avec une diminution des taux d'acétate et de butyrate, ainsi qu'un niveau plus élevé de valérate chez les individus TSA. Ces altérations sont associées à une diminution de l'abondance de taxons-clés producteurs de butyrate (*Ruminococcaceae*, *Eubacterium*, *Lachnospiraceae* et *Erysipelotrichaceae*) et une augmentation de l'abondance de bactéries associées au valérate (*Acidobacteria*). Les enfants atteints de TSA souffrant de constipation présentaient un enrichissement en *Fusobacterium*, *Barnesiella*, *Coprobacter* et en *Actinomycetaceae* associées au valérate, ainsi qu'une réduction des taxons producteurs de butyrate, suggérant un lien entre les AGCCs et la constipation chez ces enfants (Liu et al., 2019).

Une autre étude coréenne montre une augmentation du taux d'AGCCs total dans les selles d'enfants TSA par rapport à des contrôles neurotypiques (Ha et al., 2021). À l'inverse, De Angelis et collaborateurs montrent une diminution du taux de AGCCs total dans les selles d'enfants TSA par rapport aux contrôles (De Angelis et al., 2013). Chez les sujets adultes, aucune modification de concentration en AGCC n'a été observée entre les groupes TSA et neurotypiques (Gonzales et al., 2021).

Dans les modèles animaux, une teneur cœcale plus élevée en butyrate a été rapportée chez les souris (principalement chez les mâles) exposées *in utero* au VPA (de Theije et al., 2014) et chez les souris BTBR (Golubeva et al., 2017). En revanche, Kong et collaborateurs observent une diminution de la quantité totale d'AGCCs ainsi que du métabolisme de l'acide butyrique mais une augmentation du métabolisme de l'acide propionique dans les selles de rats exposés *in utero* au VPA (Kong et al., 2021).

Ainsi, le consensus n'est pas encore clair quant à la part de l'altération des AGCCs comme marqueurs et acteurs potentiels dans la physiopathologie de l'autisme.

2. Les acides biliaires secondaires

L'étude des modèles animaux des TSA nous indique des pistes d'une potentielle altération des acides biliaires secondaires par les bactéries du microbiote intestinal dans l'autisme. Ainsi, en 2017, Golubeva et collaborateurs ont observé des concentrations plasmatiques et fécales différentes d'acides biliaires secondaires chez les souris BTBR par rapport aux souris contrôle C57BL/6. Les souris BTBR présentent dans leur plasma une diminution des acides biliaires primaires CA et CDCA, ainsi qu'une diminution des acides biliaires secondaires DCA et UDCA, mais pas de LCA. Les concentrations fécales montrent seulement une diminution du LCA, mais une augmentation des acides biliaires tauro-conjugués (T) totaux, et plus précisément des TCDCA, TDCA, TLCA et TUDCA (Golubeva et al., 2017). Plus récemment, Gonzales et collaborateurs ont mesuré les taux d'acides biliaires primaires et secondaires dans les fèces d'individus adultes avec TSA et ont observé une augmentation de la concentration en DCA chez le groupe TSA comparé au groupe neurotypique (p.value 0.057) (Gonzales et al., 2021)

De façon intéressante, des altérations du métabolisme du cholestérol, et plus précisément une hypocholestérolémie, ont été rapportées dans l'autisme (Lin et al., 2023), ce qui pourrait prédire des atteintes dans le métabolisme des acides biliaires.

Lors de ce travail de thèse, nous avons analysé les niveaux d'acides biliaires primaires et secondaires dans les selles d'individus avec autisme, adultes, et avons investigué le rôle des acides biliaires secondaires sur la connectivité des neurones entériques. Cette étude contribue à une meilleure compréhension du rôle de ces métabolites, qui semblent être impactés dans l'autisme, sur

le système nerveux entérique et leur potentielle implication dans les troubles gastro-intestinaux associés aux TSA (Le Dréan et al., en préparation).

3. Autres métabolites notables dans l'autisme

a- Les LPS

Les LPS (lipopolysaccharide) sont des endotoxines dérivées de la membrane externe des bactéries Gram⁻. Les LPS sont relâchés des membranes bactériennes lors de la destruction bactérienne et possèdent une forte capacité pro-inflammatoire, agissant sur les cellules par le biais des récepteurs TLR (*Toll-like receptors*) et provoquant la libération de cytokines pro-inflammatoires (Oh & Cheon, 2020). Chez la souris, l'exposition *in utero* aux LPS via une infection par des bactéries Gram⁻ induit des comportements de type autistique, comprenant des altérations sociales (Kristen et al., 2010) et une exacerbation des comportements répétitifs (Carlezon Jr et al., 2019).

De manière intéressante, ce sont les souris mâles qui présentent les altérations comportementales les plus marquées, résonnant avec le sexe ratio de l'autisme, touchant 4 garçons pour 1 fille. Ces résultats suggèrent que certaines caractéristiques des TSA peuvent survenir si une réaction immunitaire est déclenchée par des changements dans le MI ou une infection bactérienne tôt dans la vie, comme le montrent les modèles MIA dans l'étude de l'autisme ainsi que les études sur l'impact d'une infection maternelle durant la grossesse sur le risque de développer un TSA sur la descendance.

b- Le p-cresol

Le p-cresol est un métabolite bactérien pouvant agir comme une toxine dans divers processus métaboliques chez l'humain, et étant associé à des anomalies du système nerveux (Oh & Cheon, 2020). Une bactérie reconnue pour former du p-cresol est *Clostridium difficile* capable de stimuler l'expression de l'enzyme p-hydroxyphénylacétate (pHPA) induisant la fermentation de la tyrosine en p-cresol. Le p-cresol a été retrouvé augmenté dans les selles et urine d'enfants avec TSA (De Angelis et al., 2013 ; Persico & Napolioni 2013) et ces taux peuvent être corrélés à la sévérité de l'autisme chez des enfants avec TSA (Persico & Napolioni 2013).

Les souris exposées au p-crésol pendant 4 semaines dans l'eau de boisson présentent un déficit des comportements sociaux et une augmentation des stéréotypies. De plus, le p-crésol induit un remodelage de la composition du MI. Aussi, le transfert du microbiote fécal des souris exposées au p-crésol transfère les déficits sociaux et augmente le taux fécal de p-cresol chez les souris receveuses. Le transfert du microbiote fécal des souris témoins chez les souris exposées au p-crésol rétablit les altérations comportementales (Bermudez-Martin et al., 2021). Le p-cresol se place comme un métabolite pouvant contribuer aux symptômes de l'autisme via un remodelage du MI.

Une telle diversité de profils bactériens et, inévitablement, de métabolites bactériens crée un véritable défi pour identifier des biomarqueurs associés aux TSA, et pour l'instant, aucun métabolite n'a été clairement identifié comme biomarqueur ou molécule décisive dans la physiopathologie des TSA.

III. Approches thérapeutiques dans les TSA visant le MI

La majorité des études, qu'elles soient cliniques ou portant sur des modèles animaux des TSA, se concentrent sur des approches probiotiques (supplémentation avec une ou plusieurs souches bactériennes vivantes) ou sur le transfert de microbiote fécal, dans le but d'atténuer (et certaines fois avec succès) les symptômes comportementaux, mais aussi digestifs, des TSA.

1. Les approches probiotiques

a- Dans les modèles animaux TSA

L'administration de la souche *L. reuteri* chez les modèles VPA, *Shank3B^{-/-}* et BTBR annulent les déficits sociaux caractéristiques de ces modèles animaux de TSA (Sgritta et al., 2019). Chez les souris *Shank3* KO, la supplémentation en *L. reuteri* permet une amélioration des comportements sociaux chez les mâles et une diminution des stéréotypies chez les femelles (test d'enfouissement de billes) (Tabouy et al., 2018). Cette même souche lorsqu'elle est administrée aux mères ayant un régime riche en graisse (modèle MHFD) permet une récupération des altérations sociales et du déficit synaptique observé chez la descendance (Buffington et al., 2016). Chez les souris *germ-free*, qui présentent des altérations comportementales proches des symptômes centraux des TSA, l'administration de souche unique de probiotique comme *Bacteroides Fragilis* ou *Lactobacillus reuteri* permet la réversion de plusieurs des comportements altérés (Desbonnet et al., 2015 ; Sgritta et al., 2019). *Bacteroides fragilis* lorsqu'il est administré à la descendance des mères MIA, corrige les altérations de la perméabilité intestinale et améliore les déficits de communication, les stéréotypies et l'anxiété chez les souris (Hsiao et al., 2013).

Chez la souris *Chd8^{-/-}*, une supplémentation en *Bacteroides uniformis*, dont l'abondance est diminuée chez ce modèle, améliore les comportements de type TSA (Yu et al., 2022).

b- Etudes cliniques chez l'humain

Chez l'humain, l'utilisation de probiotiques lors d'études cliniques chez des enfants avec TSA offre quelques résultats intéressants. Dans leur étude, Liu, Wan et collaborateurs (2019) ont utilisé la souche *L. plantarum PS128* dans un essai contrôlé randomisé et en double aveugle sur une cohorte de garçons avec TSA. Ils ont observé une amélioration de l'anxiété, de l'inattention, de l'hyperactivité/impulsivité, de l'opposition/défiance et des comportements de transgression chez les enfants de 7 à 12 ans traités par probiotiques. De manière surprenante, les enfants âgés de 13 à 15 ans n'ont pas montré d'amélioration comportementale à la suite du probiotique (Liu et al., 2019). En 2018, Shaaban et collaborateurs ont supplémenté pendant 3 mois 30 enfants avec autisme (garçons et filles âgés de 5 à 9 ans) avec une combinaison de trois souches probiotiques : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium longum*. Les enfants présentaient une diminution significative du poids corporel (≈ 300 g) ainsi qu'une amélioration significative de la sévérité des troubles autistiques évaluée par l'ATEC (*Autism Treatment Evaluation Checklist*) et des symptômes gastro-intestinaux évalués par le 6-GSI (*GI Severity Index* incluant une évaluation de la constipation, de la diarrhée, de la consistance et de l'odeur des selles, de la flatulence et de la douleur abdominale) par rapport à la ligne de base évaluée au début de l'étude (Shaaban et al., 2018).

En mars 2023, est sortie la première étude clinique sur 15 individus avec TSA (âgés de 15 à 45 ans, tous des hommes) utilisant la souche probiotique déjà très étudiée chez les modèles TSA, *L. reuteri* (ou un placebo) (Schmitt et al., 2023). Le groupe *L. reuteri* présentait une amélioration de leurs comportements adaptatifs (capacité à s'engager dans des activités de la vie quotidienne, mesurée par le test Vineland-3) et de la préférence sociale, mesurée par le suivi des yeux. Les troubles gastro-intestinaux chez les participants n'ont pas été investigués. Toutefois, une récente étude pilote portant sur l'efficacité, chez l'humain, de *L. reuteri* sur les troubles comportementaux et gastro-intestinaux dans l'autisme (Kong et al., 2020) étaient suffisamment encourageants pour envisager une étude clinique à plus grande échelle. Cependant, à l'heure où sont écrites ces lignes, aucune étude clinique sur ce sujet n'est encore sortie.

A noter que la majorité des revues scientifiques compilant les études cliniques utilisant des probiotiques dans l'autisme souligne, certes, des résultats prometteurs mais pointe également le manque d'études en double aveugle, et à grandes cohortes, et concluent souvent à un manque de données scientifiques pour considérer (pour l'instant ?) la supplémentation aux probiotiques dans la prise en charge de l'autisme.

2. La transplantation fécale

La transplantation fécale représente le transfert du microbiote fécal provenant d'un donneur en bonne santé dans le système digestif d'un receveur dans le but de rétablir l'équilibre de la flore intestinale (Tartaglione et al., 2023). Cette technique, en fonction de la manière dont elle est préparée, permet de transférer les bactéries mais aussi les métabolites du microbiote fécal (Wang et al., 2023).

a- Chez le modèle murin TSA

L'utilisation des modèles murins TSA permet plusieurs combinaisons de FMT : trans-espèces, avec le transfert d'un microbiote d'humain en bonne santé à un modèle souris ASD, ou inversement (microbiote d'individu ASD à des souris naïves), ou bien des FMT intra-espèces dans lesquelles le microbiote de souris ASD est transféré à des souris naïves, et inversement.

- FMT à partir de donneurs neurotypiques

La transplantation du microbiote fécal de souriceaux témoins ou de souriceaux TSA (modèle MHFD) dans des souris *germ-free* âgées de 4 et 8 semaines et présentant « naturellement » des atteintes comportementales de type TSA est capable de normaliser le comportement social altéré chez les souris *germ-free* à 4 semaines, mais pas à 8 semaines (Buffington et al., 2016). Cette étude, bien que présentant une taille d'échantillons limitée, souligne l'existence d'une période critique au cours du développement au cours de laquelle le microbiote impacte le développement neurocomportemental de l'hôte (Cowan et al., 2020).

Une autre étude utilisant le modèle MIA a examiné le potentiel thérapeutique de la FMT à partir de donneurs humains en bonne santé. Les souriceaux MIA sevrés ont été traités par gavage tous les deux jours pendant deux semaines. Les auteurs n'ont pas observé d'amélioration des comportements sociaux mais rapportent une amélioration de l'anxiété et une réduction des comportements répétitifs chez les souriceaux MIA (Chen et al., 2020).

Dans leur étude de 2023, Wang et collaborateurs ont transplanté le microbiote fécal d'enfants TSA ou neurotypiques à des souris VPA. La FMT à partir du microbiote d'individus contrôle restaure le déficit de sociabilité des souris VPA et diminue leur anxiété, alors que la transplantation du microbiote TSA aggrave les troubles comportementaux des souris. L'analyse métabolomique des souris receveuses montre une altération des voies métaboliques sérotoninergiques et glutamatergiques dans le cerveau, ainsi que des modifications d'expression de gènes liés à la connectivité neuronale qui pourraient être à l'origine des changements comportementaux (Wang et al., 2023). Les auteurs n'ont pas investigué les fonctions digestives ou le SNE des souris VPA receveuses.

- **FMT à partir de donneurs TSA**

La colonisation avec le microbiote d'enfants atteints de TSA chez des souris *germ-free* gestantes conduit chez la descendance au développement des comportements autistiques chez les souris receveuses, avec une exacerbation des comportements répétitifs ainsi qu'une réduction de la locomotion et de la communication par rapport aux souris qui ont reçu la FMT d'individus contrôles (neurotypiques). Ces altérations étaient plus prononcées chez les souris mâles que chez les souris femelles (Sharon et al., 2019). Dans une autre étude, les analyses ont été conduites directement sur les souris *germ-free* transplantées avec du microbiote fécal d'enfants TSA ou neurotypiques. Les souris transplantées avec le microbiote TSA présentaient une augmentation de l'anxiété (observée en open field), une augmentation du temps de toilettage, et une diminution de la sociabilité (test des trois chambres). Les souris ayant reçu la FMT-TSA présentaient aussi une altération de la voie métabolique du tryptophane, observée par l'analyse métabolomique sur le contenu caecal des souris mais aussi sur les selles des enfants TSA dont provient la FMT (Xiao et al., 2021). Aucune de ces deux études ne s'est intéressée aux troubles GI chez les souris receveuses.

Dans ce contexte des troubles GI, Avolio et collaborateurs rapportent une augmentation des facteurs inflammatoires (COX-1 et TNF- α) dans l'intestin de souris transplantées avec le microbiote fécal d'enfants TSA. Ces souris présentaient aussi une atrophie des villosités dans l'intestin grêle ainsi que des altérations comportementales (diminution de la sociabilité, augmentation de l'anxiété). Cette étude souligne le potentiel pro-inflammatoire du microbiote TSA et son impact sur la structuration du système digestif, même si les auteurs n'examinent pas les fonctions digestives des souris receveuses (Avolio et al., 2022).

Ici aussi, les microbiotes fécaux humains utilisés proviennent, pour la grande majorité, d'enfants avec autisme, et un manque de données apparaît alors concernant l'investigation du microbiote intestinal chez les individus TSA adultes. De plus, la majorité des études n'étudie pas l'impact de la FMT sur les fonctions digestives et le remodelage du SNE. Durant mes travaux de thèse, j'ai pu participer à une étude de FMT du microbiote fécal d'individus TSA adultes avec ou sans troubles gastro-intestinaux ou bien neurotypiques sans trouble GI (contrôles) chez la souris naïve. Cette étude, toujours en cours, s'intéresse au potentiel pathologique du microbiote intestinal TSA dans l'altération du comportement mais surtout des fonctions digestives et du SNE chez les souris receveuses (Marchix, Le Dréan et al., en préparation).

b- Chez l'humain : Etudes cliniques

Chez les humains, quelques études cliniques ont été mises en place. En 2017, Kang et collaborateurs ont réalisé une FMT, où 18 enfants (âgés de 7 à 16 ans) avec autisme et troubles gastro-intestinaux ont été déplétés de leur microbiote intestinal par un traitement antibiotique

(vancomycine), puis ont reçu, par voie orale ou rectale, une transplantation de microbiote intestinal humain standardisé (SHGM - *Standardized Human Gut Microbiota*) composé à plus de 99 % de bactéries collectées à partir de selles de personnes en bonne santé (Kang et al., 2017). La FMT a augmenté la diversité bactérienne et réduit d'environ 80 % la sévérité des troubles gastro-intestinaux, notamment la constipation, la diarrhée et les douleurs abdominales. De même, la sévérité des symptômes comportementaux de l'autisme a nettement diminué par rapport au niveau de base avant le traitement. Ces améliorations persistent jusqu'à 2 ans après le traitement (Kang et al., 2019).

D'autres études cliniques ont été menées par différentes équipes rapportant des effets bénéfiques de la FMT provenant d'individus neurotypiques sur les symptômes comportementaux de l'autisme et les troubles gastro-intestinaux (Li et al., 2021 ; Zhang et al., 2022 ; Pan et al., 2022 ; Huang et al., 2022).

Ainsi, la FMT semble efficace pour améliorer les symptômes de l'autisme. Cependant, la littérature est encore jeune et manque d'essais cliniques randomisés avec des contrôles placebo et des cohortes plus importantes (hommes et femmes) pour établir de façon robuste la sécurité et l'efficacité de la FMT en tant que traitement pour l'autisme (Zhang et al., 2023). D'autant plus que cette technique peut être invasive (antibiotiques, administration voie rectale) et éprouvante pour des individus avec TSA.

3. Autres approches : Supplémentation en AGCCs

Comme vu dans les paragraphes précédents, les AGCCs sont fréquemment rapportés comme étant modifiés dans les TSA, ainsi que dans les modèles animaux des TSA. Des approches thérapeutiques basées sur une supplémentation en AGCCs, et plus précisément du butyrate, sont alors explorées.

Des souris BTBR adultes ont été supplémentées en butyrate sous la forme d'injection intrapéritonéale de sodium butyrate tous les jours pendant 10 jours. Ce traitement augmente la sociabilité des souris BTBR, diminue leur comportement stéréotypé (test d'enfouissement de bille) mais n'impacte pas leur temps de toilettage ni leur niveau d'anxiété. Ces modifications comportementales sont associées à des changements d'expression de gènes liés à l'activité neuronale dans le cortex préfrontal (Kratsman et al., 2016). De façon intéressante, une étude récente a montré une efficacité accrue du sodium butyrate dans le modèle BTBR sur les déficits en interaction sociale et les comportements répétitifs lorsqu'il est administré en combinaison avec un prébiotique (α -lactalbumine) (Leo et al., 2021). De plus, la supplémentation des mères BTBR avec le sodium butyrate améliore les comportements autistiques de la descendance, indiquant une possible utilisation du sodium butyrate dans le cadre de stratégie préventive chez des mère « à risque » (Cristiano et al., 2022).

Il est important de noter que la supplémentation en AGCCs n'est pas que bénéfique, et qu'une administration de propionate en forte dose chez les rats conduit au développement de comportements autistiques associés à des atteintes inflammatoires chez les animaux (MacFabe et al., 2011 ; Choi et al., 2018).

En conclusion, le MI et ses métabolites constituent une fenêtre sur les interactions incroyablement riches et complexes de l'axe microbiote-intestin-cerveau. A ce jour, ils apparaissent comme des cibles thérapeutiques prometteuses pour soulager les troubles comportementaux et digestifs des TSA.

Objectifs de thèse

L'autisme est fortement associé à des troubles GI dont la sévérité est corrélée à la sévérité des symptômes comportementaux des TSA. Ces observations amènent à l'hypothèse que, **dans les TSA, en plus des atteintes du SNC, il y aurait des atteintes du SNE**. Alors, décrypter les troubles GI dans l'autisme nécessite de mieux caractériser le système nerveux entérique dans le contexte de cette pathologie. L'autisme est accompagné de nombreux facteurs génétiques et environnementaux qui peuvent impacter le remodelage et le fonctionnement du SNE.

L'étude des effets de ces divers facteurs sur le SNE constitue un vaste domaine de recherche, au sein duquel s'inscrit cette thèse.

Les objectifs de cette thèse sont multiples et organisés en 2 axes principaux :

Le premier axe caractérise l'implication de molécules associées à l'autisme dans la connectivité neuronale et le fonctionnement du SNE. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la protéine de guidage axonale Sémaphorine 5A, associée à l'autisme et dont des mutations sur son gène SEMA5A sont retrouvées dans les TSA. Cet axe possède deux sous-objectifs : Le premier est de caractériser le rôle de la sémaphorine 5A dans le SNE, un rôle qui n'a encore jamais été investigué, et le deuxième est d'étudier l'impact d'une mutation génétique de la Sema5A, retrouvée dans l'autisme, sur l'action de cette protéine sur le SNE.

Ce premier axe a donné lieu à un premier article, en révision dans *iScience*. Dans cet article, nous avons montré que la sémaphorine 5A ainsi que ses récepteurs Plexin A1 et Plexin A2 étaient exprimés par les neurones entériques et que la sémaphorine 5A modifie fonctionnellement l'activité synaptique en impactant la libération des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons nerveuses des neurones entériques. Cette action pourrait être médiée par des régulations de la phosphorylation de la protéine pré-synaptique synapsin-1. De manière intéressante, la forme mutée de la Sema5A retrouvée dans l'autisme abolit ces effets.

Le deuxième axe s'intéresse au microbiote intestinal, un facteur environnemental en plein essor et très important dans la physiologie digestive de l'hôte. Cet axe caractérise l'impact de médiateurs issus du microbiote intestinal sur le fonctionnement et la connectivité du SNE. Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur les métabolites que sont les acides biliaires secondaires, retrouvés en concentration augmentée dans les selles de femmes avec TSA.

Ce deuxième axe est porté par un deuxième article en préparation, dont les premiers résultats sont présentés dans cette thèse. Nous avons montré que l'exposition chronique des neurones entériques à l'acide désoxycholique (DCA), retrouvé augmenté dans les selles de femmes avec TSA, induit un remodelage du réseau neuronal et synaptique, associé à une modification de l'activité synaptique et de l'activité spontanée des neurones entériques.

Un premier article dans lequel je suis 2nd auteur et publié dans *Frontiers in Neuroscience*, ouvre cette section des résultats et caractérise le modèle de culture de neurones entériques purifiés qui a été abondamment utilisé lors de mes travaux de thèse.

Article 1

A functional network of highly pure enteric neurons in a dish

Martial Caillaud, **Morgane E. Le Dréan**, Adrien De-Guilhem-de-Lataillade, Catherine Le Berre-Scoul, Jérôme Monnath, Steven Nedellec, Gildas Lousouarn, Vincent Paillé, Michel Neunlist and Hélène Boudin

Publié dans *Frontiers in Neuroscience* – 06 Janvier 2023



OPEN ACCESS

EDITED BY

Nick Spencer,
Flinders University, Australia

REVIEWED BY

Conor McCann,
University College London, United Kingdom
Pieter Vanden Berghe, KU Leuven, Belgium

*CORRESPONDENCE

Martial Caillaud martial.caillaud@univ-nantes.fr



SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Autonomic Neuroscience, a section of the journal Frontiers in Neuroscience

RECEIVED 05 October 2022

ACCEPTED 02 December 2022

PUBLISHED 06 January 2023

CITATION

Caillaud M, Le Dréan ME, De-Guilhem-de-Lataillade A, Le Berre-Scoul C, Montnach J, Nedellec S, Loussouarn G, Paillé V, Neunlist M and Boudin H (2023) A functional network of highly pure enteric neurons in a dish. *Front. Neurosci.* 16:1062253. doi: 10.3389/fnins.2022.1062253

COPYRIGHT

© 2023 Caillaud, Le Dréan, De-Guilhem-de-Lataillade, Le Berre-Scoul, Montnach, Nedellec, Loussouarn, Paillé, Neunlist and Boudin. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

A functional network of highly pure enteric neurons in a dish

Martial Caillaud^{1*}, Morgane E. Le Dréan¹, Adrien De-Guilhem-de-Lataillade¹, Catherine Le Berre-Scoul¹, Jérôme Montnach², Steven Nedellec³, Gildas Loussouarn², Vincent Paillé⁴, Michel Neunlist¹ and Hélène Boudin¹

¹Nantes Université, INSERM, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France, ²Nantes Université, CNRS, INSERM, L'institut du Thorax, Nantes, France, ³Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, BioCore, US16, SFR Bonamy, Nantes, France, ⁴Nantes Université, INRAE, IMAD, CRNH-O, UMR 1280, PhAN, Nantes, France

The enteric nervous system (ENS) is the intrinsic nervous system that innervates the entire digestive tract and regulates major digestive functions. Recent evidence has shown that functions of the ENS critically rely on enteric neuronal connectivity; however, experimental models to decipher the underlying mechanisms are limited. Compared to the central nervous system, for which pure neuronal cultures have been developed for decades and are recognized as a reference in the field of neuroscience, an equivalent model for enteric neurons is lacking. In this study, we developed a novel model of highly pure rat embryonic enteric neurons with dense and functional synaptic networks. The methodology is simple and relatively fast. We characterized enteric neurons using immunohistochemical, morphological, and electrophysiological approaches. In particular, we demonstrated the applicability of this culture model to multi-electrode array technology as a new approach for monitoring enteric neuronal network activity. This *in vitro* model of highly pure enteric neurons represents a valuable new tool for better understanding the mechanisms involved in the establishment and maintenance of enteric neuron synaptic connectivity and functional networks.

KEYWORDS

enteric neuron, enteric synapse, spontaneous activity, lipid-mediated transfection, multi-electrode array, patch-clamp

circular and longitudinal muscle layers) and the submucosal plexus (located between the circular muscle layer and the mucosa) (Brookes, 2001; Schemann and Neunlist, 2004; Kang et al., 2021). The ENS consists of two major cell types; enteric neurons and enteric glial cells (EGCs), derived from enteric neural crest cells that colonize the gut during embryogenesis (Burns and Pachnis, 2009; Kang et al., 2021). A functional neural network has been established following a complex program of developmental maturation extending to the postnatal period (Burns and Pachnis, 2009; Gershon, 2010). Coordinated activity of the enteric neuronal network, through poorly characterized mechanisms regulates major functions of the digestive tract, such as intestinal epithelial permeability, secretion and gut motility (Schemann and Neunlist, 2004). In addition, alterations in the ENS and its functions (known as enteric neuropathies) have been associated with or described as being responsible for gut dysfunction in various gastrointestinal diseases, manifested notably by impaired motility and peristalsis (Burns et al., 2009; Gonzales et al., 2020; Holland et al., 2021).

Neuronal connectivity is a key physiological process involved in ENS function (Nestor-Kalinowski et al., 2022). At the organ level, neuronal connectivity is defined as structural and functional connectivity contributing to neuronal network activity, which is translated at the cellular level by synaptic communication (Park and Friston, 2013). It has been suggested that perinatal development of enteric neuronal connectivity and neurotransmitter expression by neurons play a key role in intestinal motility control (Hao and Young, 2009; Foonget al., 2012). On the other hand, disruption of key processes involved in neuronal connectivity has been reported to impact gastrointestinal motility (Chalazonitis et al., 2011; Sasselli et al., 2013). At the molecular level, key factors known to regulate brain neuronal connectivity, such as members of the Semaphorin and Ephrin families, have been identified to play a putative role in ENS maturation (Gonzales et al., 2020; Bodin et al., 2021). However, a better understanding of the mechanisms regulating neuronal connectivity and its impact on ENS function remains a major problem. This lack of understanding is partly due to the absence of experimental *in vitro* models of enteric neurons. Pure culture models of central neurons have been developed for decades and have proven to be valuable tools for studying fundamental neuronal processes, including dendrite and axon formation, neuronal plasticity, and synaptic activity (Smiałowska and Legutko, 1992; Ray et al., 1993; Yang et al., 2010). Most *in vitro* models of ENS are composed of a mixed culture of enteric neurons, EGCs, and myofibroblasts (Schonkeren et al., 2022), and have provided invaluable data on the identification of trophic factors for enteric neuron development (Heuckeroth et al., 1998; Gougeon et al., 2013) and on the mechanisms regulating neurotransmitter expression (Chevalier et al., 2008). To address glial functions more specifically, pure cultures of EGCs have been developed and used to demonstrate their role in the regulation of intestinal

epithelial barrier functions and neuronal development (Van Landeghem et al., 2011; Le Berre-Scoul et al., 2017). However, pure cultures of enteric neurons with dense neuronal networks that are applicable for long-term studies are currently lacking. Several culture models enriched in enteric neurons have been developed, but resulted in cultures that are incompletely pure in enteric neurons (Wu et al., 1999; Sato and Heuckeroth, 2008), with a sparse neuronal network (Bannerman et al., 1988) or containing non-functional neurons (Hawkins et al., 2013).

Commonly used methods for studying enteric neuronal activity are based on calcium (Ca^{2+}), voltage-sensitive dye (VSD) imaging, and patch clamp (Vanden Berghe et al., 2001, 2008; Schemann et al., 2002; Bodin et al., 2021). As an emerging electrophysiological technique, the multi-electrode array (MEA) represents a particularly suitable approach for monitoring functional neuronal networks in a prolonged and non-invasive manner, enabling repeated recordings on the same culture over several weeks. Unlike Ca^{2+} and VSD imaging, MEAs do not rely on fluorescent dyes; thus preventing phototoxicity and photobleaching. In addition, MEA is less time-consuming than conventional single-cell electrophysiological techniques such as patch clamp, although it offers a lower degree of spatial resolution. The application of MEA to central nervous system (CNS) neuron cultures has provided a better understanding of neuronal network features, including network dynamics and signal propagation waves (Amin et al., 2016); however, MEA has never been applied to enteric neuron network studies, which might be partly due to the unavailability of enriched neuronal cultures at high density required for this technique. Although a study using a MEA system allowed to characterize the spatial properties of oscillating electrical activity in *ex vivo* mouse ileum, the data collected did not provide a fine analysis of enteric neuronal networks, but rather an overview of a cellular cooperation including muscle, neuronal and interstitial cells (Taniguchi et al., 2013). Finally, a second study recently reported the application of myenteric neuron cultures in MEA chips but without presenting the corresponding recordings (Schulte et al., 2021).

Therefore, this study aimed to develop a long-term culture system for highly pure enteric neurons from rat embryos. We demonstrated that our procedure resulted in highly enriched enteric neuron culture. The main features of enteric neurons were measured by morphological, phenotypic, and functional characterization by immunofluorescence, western blot, electrophysiology, and live imaging approaches. In addition, we found that these cultured enteric neurons established synaptic connections and were organized in a functional neuronal network, as shown by patch-clamp, FM 1-43, and MEA recordings. This novel enteric neuron culture model provides a valuable tool for studies targeting cell-autonomous mechanisms involved in the establishment and maintenance of enteric neuronal connectivity.

Materials and methods

Animals

We cultured enteric neurons from rat embryo intestines. We obtained pregnant Sprague-Dawley rats on gestational day 15 (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France). The rats were anesthetized with isoflurane and euthanized by cervical dislocation. We collected the embryos and extracted the intestines for cell culture. All animal experiments were performed in accordance with the French Standard Ethical Guidelines for Laboratory Animals.

Enteric neurons cell culture

Isolation and dissection of the intestines have been previously described (Le Berre-Scoul et al., 2017). Embryonic day 15 (E15) rat intestines were collected and finely dissected in cold Hank's buffered salt solution (HBSS). Each whole intestine (duodenum to sigmoid colon) was individually placed in a drop of cold HBSS in a Petri dish and cut into 8 pieces of equal length. We placed the 8 pieces of each intestine (referred later as explants) in a 24-well plastic culture plate (Corning®-Costar®, ref 3524, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) previously coated with poly-L-lysine 0.1 mg/mL and covered it with a glia-conditioned culture medium with GDNF 50 ng/ml (R&D Systems – bio-technie, 512-GF-050/CF). We obtained the culture medium from an EGC culture. Enteric glial cell cultures were obtained from ENS primary cultures derived from rat embryonic intestines (Van Landeghem et al., 2011). Briefly, EGC was cultured in DMEM (41965-039- Gibco) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated FBS (Eurobio), 10 mM glutamine (25030-024-Gibco), 50,000 IU Penicillin/50,000 IU Streptomycin (15140-122-Gibco). When EGCs were at 50% confluence, DMEM was replaced for 72 h with Neurobasal Medium (ref 21103-049-Gibco) supplemented with B27 (ref: 17504-044-Gibco), 10 mM Glutamine (ref 25030-024-Gibco), 50,000 IU Penicillin/50,000 IU Streptomycin (ref 15140-122-Gibco). This glia-conditioned medium was then filtered through a sterile 0.22 μ M PolyEhterSulfone membrane before storage (-20° C) or used. After 5 days of culture (D5), many cells emerged from the explants and covered a large part of the well. We removed the explants using a P1000 pipette, and detached the cells with 300 μ l of Accutase per well for 5 min. Accutase was inhibited by adding 4.7 ml of DMEM + FBS and cell suspensions were centrifuged at 1,500 rpm for 5 min at room temperature (RT). The cell pellet was suspended in conditioned-glia medium + GDNF (50 ng/ml) and seeded either in a P24 plate for immunofluorescence, on an 18 mm diameter coverslip (Neuvitro corp., Vancouver, WA, USA) for patch clamp, in a MEA chamber or in Ibidi 8-well plate for Ca^{2+} and VSD

imaging, all previously coated with poly-L-lysine 0.1 mg/ml. At D6, an antimetabolic (cytosine arabinoside: AraC, 5 μ M) was added to the medium to eliminate the remaining glial and muscle cells. Purified neurons were used for functional and morphological tests on D11 and D12.

Immunostaining

We fixed cells with 4% paraformaldehyde for 15 min. The cells were permeabilized for 5 min in 0.25% Triton-X-100 in PBS at RT. After washing twice in PBS, cells were incubated for 30 min in blocking solution (PBS containing 10% BSA) at RT. Cells were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with the primary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA. The primary antibodies used were as follows: mouse anti-S100 β (1:3, Dako, Les Ulis, France), mouse anti- α -smooth muscle actin (α -SMA, 1:2000, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), goat anti-Hu (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-Hu (1:500; Molecular probe), rabbit anti-neuronal nitric oxide synthase (nNOS; 1:500; Enzo), goat anti-choline acetyltransferase (ChAT; 1:200; Millipore), mouse anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2; 1:500, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), rabbit anti-Synapsin-1 (1:1,000, Cell Signaling), rabbit anti- β III-tubulin (Tuj1, 1:500, Abcam), and mouse anti-PSD95 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Cillebon sur Yvette, France). After washing, we incubated the cells for 90 min at room temperature with the appropriate FITC-conjugated or Alexa 568-conjugated secondary antibody diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide. Cells were washed with PBS containing DAPI (Molecular Probes). For each sample, images were acquired using an Axio observer Zeiss microscope (Zeiss, Germany) and Zen software (Zeiss, Germany) and were taken from three randomly chosen fields. Images were quantified using the ImageJ software. Data are presented as mean \pm SEM of $n = 4$ culture wells from 4 independent rat embryos.

Analysis of confocal images

For visualization of synaptic clusters stained by synapsin-1 and PSD95, images were acquired with x60, numerical aperture (NA) 1.4 oil immersion objective using a scanning confocal microscope (NIKON A1 RSi, Nikon, Tokyo, Japan) driven by NIS-Elements software. High resolution 3D confocal images were done accordingly to the Nyquist sampling rate (0.1 μ m XY and 0.15 μ m Z step) and processed with the Lucy Richardson deconvolution algorithm (NIS-Elements Software). In each sample, the two fluorophores (FITC or Cy5) were recorded separately using sequential scanning to eliminate the possibility of overlapping emission.

ENS rat primary culture

Primary cultures of rat ENS (mixed culture with muscle, glia, and neuronal cells) were generated and cultured as previously described (Chevalier et al., 2008). Briefly, the intestines of rat embryos at E15 (Sprague–Dawley rat, Janvier Laboratories SA, Le Genest-St-Isle, France) were finely diced and digested at 37 °C for 15 min in DMEM-F12 (Gibco, Life Technologies, Cat# 31330-038) with 0.1% (w/v) trypsin (Sigma, Cat# T1426). The

trypsin reaction was stopped by a medium containing 10% (v/v)

fetal bovine serum (Sigma, Cat# F2442) and then treated with 0.01% (w/v) DNase I (Sigma, Cat# DN25) for 10 min at 37 °C. After trituration, we centrifuged the cells at 750 rpm for 10 min, and seeded them in 48-well plates previously coated for 30 min at 37 °C with a solution of 0.5% (w/v) gelatin (Sigma, Cat# G6144). After 24 h, the medium was replaced with a serum-free DMEM-F12 medium containing 1% (v/v) of N-2 supplement (Life Technologies, Cat# 17502-048).

Western blot

Enteric nervous system and highly pure enteric neuron cultures were lysed in RIPA buffer (20-188, Millipore), completed by phosphatase (phosphatase inhibitor cocktail3, P0044, Sigma-Aldrich) and protease inhibitors (protease inhibitor cocktail, 11873580001, Roche), and then sonicated. Total protein content was quantified using the Pierce BCA protein assay kit (23225, Thermo Fisher Scientific) before adding an adjusted volume of sample reducing agent (NP0009, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and LDS Sample Buffer (NP0008, Thermo Fisher Scientific).

Equal amounts of lysate were separated using NuPage 10% Bis-Tris Gels (Thermo Fisher Scientific), together with the 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid/sodium dodecyl sulfate (MES-SDS, B0002, Thermo Fisher Scientific) running buffer, before electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes using the iBlot™ Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific). Membranes were then blocked for 1 h at room temperature in TBS with 0.1% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) non-fat dry milk and incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-Tuj1 (1:1,000; T8660, Sigma), mouse monoclonal anti-PGP 9.5 (1:1,000, MA1-83428, Thermo Fisher Scientific), mouse monoclonal anti-GFAP (1:1000, GA5, IF03L, Calbiochem), rabbit polyclonal anti- α -SMA (1:1000, ab5694, Abcam). To confirm equal protein loading, the membranes were probed with a mouse monoclonal anti- β -actin antibody (1:10,000; A5441, Sigma). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (1:5,000; Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) and visualized by enhanced chemiluminescent detection using Clarity ECL substrate (1705061, Biorad). The immunoreactive bands were

imaged using laser-scanning densitometry and Image Lab software (Bio-Rad).

Transfection

We collected explant-derived cells after Accutase treatment on D0, resuspended in 2 ml of conditioned glia medium, and transfected them by incubation for 1h at 37 °C with 1 μ l

Lipofectamine® (Invitrogen) and 1 μ g of cDNA encoding

membrane-targeted GFP (mGFP) cDNA [GAP-GFP(S65T), a gift from Dr. K. Moriyoshi, Kyoto University, Japan (Moriyoshi et al., 1996)]. The cell suspension was then distributed into four wells of a 48-well plastic culture plate. On D3, cultures were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min for microscopic analysis.

Morphological analysis of transfected neurons

Transfected neurons were analyzed by microscopy (Axio Observer Zeiss, Germany; Objectif X20). The transfection rate was calculated by counting the number of mGFP + neurons in a 48-well culture plate, normalized by the number of Hu + cells in the same well. We counted cells using the multi-point tool in the ImageJ software. The morphological classification of transfected neurons was based on the number and length of axons arising from the cell body as well as the diameter of the cell body. In addition, the dendritic morphology was scored as lamellar or filamentous according to previous studies (Foong et al., 2012). A total of 183 GFP-positive neurons have been analyzed from $n = 6$ culture wells from three independent rat embryos.

Synaptic vesicle recycling

Synaptic vesicle endo/exocytosis recycling by enteric neurons was studied using FM1-43 imaging (Molecular Probes) in Ibidi 8-well plate (μ -Slide 8 Well, #80826, Gräfelfing, Germany). Neurons were loaded for 60 s at 37 °C with 5 μ g/ml of FM 1-43 in 1 ml of stimulation buffer composed of 31.5 mM NaCl, 90 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 25 mM HEPES, 30 mM glucose solubilized in H₂O at pH 7.4. Cells were washed for 15 min at 37 °C in Ca²⁺-free washing buffer (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, and 30 mM glucose solubilized in H₂O at pH 7.4) to avoid unloading by spontaneous activity. Finally, Ca²⁺-free washing buffer was removed and replaced by stimulation buffer. The cells were imaged for 60 s at 37 °C (in the stimulation buffer). Dynamic experiments (30 fps) were performed using a resonant scanning confocal microscope (NIKON A1 RSi, Nikon, Tokyo, Japan)

with an oil-immersion objective ($\times 63$, NA, 1.40). Excitation and emission wavelengths were respectively set at 488 and

595 nm, accordingly to FM1-43 fluorescence spectrum. We analyzed images using the ImageJ software. The percentage of fluorescence after 60 s was calculated for each cluster using the formula: $((F_{0s}-F_{60s})/F_{0s}) \times 100$ where F_{0s} is the fluorescence intensity at 0 s and F_{60s} at 60 s. Previous studies conducted in hippocampal neurons have described different populations of destaining events that might reflect different mode of exocytosis (Richards et al., 2005). We thus classified the FM1-43 synaptic clusters based on their percentage of remaining fluorescence at 1 min as compared to fluorescence intensity measured at t_0 . We have arbitrarily defined 3 types of synaptic clusters according to the remaining FM1-43 fluorescence at 1 min. The first type was defined by synaptic clusters retaining a high level

of fluorescence intensity ($\geq 80\%$ of cluster's intensity at t_0), the second type by synaptic clusters retaining a low level of fluorescence intensity ($\leq 50\%$) and the last type by synaptic clusters retaining an intermediate level of fluorescence intensity (comprised between 80 and 50%). A total of 154 FM1-43-positive clusters have been analyzed in three culture wells from three independent rat embryos. To assess the impact of putative photobleaching on fluorescence, cultures loaded with FM1-43 were recorded for one minute in washing buffer. In these non-stimulated conditions, we observed that the remaining FM1-43 fluorescence intensity was in average $99.1 \pm 0.6\%$ (SEM) at 1 min as compared to fluorescence intensity measured at t_0 . Analysis performed on two culture wells from two independent rat embryos.

Calcium imaging

We performed Ca^{2+} imaging using Cal-520, AM dye (Abcam, Cambridge, UK) in Ibidi 8-well plates (μ -Slide 8 Well, #80826, Grärfelfing, Germany). Neurons were loaded into glia-conditioned medium supplemented with Cal-520 AM dye (5 μ M) for 60 min at $37^\circ C$ in a cell culture incubator. High-frame-rate (60 fps) images were recorded using a resonant scanning NIKON A1 RSi confocal microscope (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) with a dedicated oil immersion objective ($\times 63$, NA, 1.40) and a temperature ($37^\circ C$)/ CO_2 (5%) controller. The dye was excited by a laser source at 488 nm and the fluorescence signal was recorded at 520 nm. Video acquisition was performed using the Nikon imaging software NIS-Elements. We analyzed the images using the ImageJ software. The fluorescence intensity was measured in region of interest (ROI) delimitating neuronal cell bodies for spontaneous activity and upon pharmacological stimulations. Data were represented as changes in fluorescence intensity according to the formula $\Delta F = F/F_0$, where F_0 is the minimum fluorescence intensity. The different Ca^{2+} transient patterns were defined according to the criteria previously reported (Margiotta et al., 2021) i.e., isolated (simple peaks), tightly clustered (compound peaks) and moderately clustered

Ca^{2+} transients (a mixture of simple and compound peaks). The analyses were carried out on a total of 70 neurons from $n = 4$ cultures from 4 independent rat embryos. Cells were stimulated or inhibited with the following pharmacological compounds veratridine (30 μ M, Sigma), Di-MethylPhenylPiperazinium (DMPP, 10 μ M, Sigma), 2 (3)-O-(4-benzoylbenzoyl)-Adenosine TriPhosphate (BzATP, 100 μ M, Sigma), Potassium Chloride (KCl, 75 mM, Sigma), and Tetrodotoxine (TTX, 0.5 μ M, Sigma). The analyses were carried out on a total of 44 neurons from $n = 4$ culture wells from 4 independent rat embryos.

Voltage-sensitive dye imaging

We performed voltage-Sensitive Dye (VSD) imaging using the FluoVolt™ membrane potential kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in Ibidi 8-well plates (μ -Slide 8 Well, #80826, Grärfelfing, Germany). Neurons were loaded into glia-conditioned medium supplemented with the 1000X FluoVolt™ dye (1/1000) and the 100X Power Load Concentrate (1/100) for 15–20 min at $37^\circ C$ in an incubator. Similarly, for calcium imaging, the dye was excited at 488 nm, and the fluorescent signal recorded at 520 nm using a resonant scanning confocal microscope (NIKON A1 RSi) at $37^\circ C$ and 5% CO_2 . We acquired images at 500 fps and analyzed them using the ImageJ software. Fluorescence intensity data were measured in an ROI of inter-cluster fibers. The fibers were classified according to their size with the following criteria: small-caliber fibers = width $\leq 1 \mu m$ and large-caliber fibers = width $\geq 1 \mu m$. Spontaneous activity data were presented as changes in fluorescence intensity according to the formula $\Delta F = F/F_0$, where F_0 is the minimum fluorescence intensity. The analyses were carried out on a total of 15 fibers from $n = 4$ culture wells from four independent rat embryos.

Patch clamp electrophysiology

We transferred isolated enteric neurons to a recording chamber and perfused them continuously with an external solution containing (in mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 0.33 NaH_2PO_4 , 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 5 HEPES, and 5 Glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH, and osmolarity adjusted to 300 mosmol) at room temperature. Neurons were visualized using an Olympus microscope (BX51WIF; Olympus Corporation, Japan) and an X40 water-immersion objective (Olympus U-CAMD3; Olympus Corporation, Japan). Recordings were performed using borosilicate pipettes (glass capillaries GC150TF-10, Harvard apparatus, USA) prepared with a micropipette puller (PC-10, Narishige Co, LTD, Japan). Electrodes (7-8 Mohm) were filled with a solution containing the following (100 mM K-aspartic acid, 30 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 4.5 mM ATP, 10 mM HEPES, and 6 mM EGTA (pH adjusted to 7.2 with KOH, and osmolarity was adjusted to 300 mosmol).

We recorded data using a HEKA amplifier (EPC10 USB double) and the PATCHMASTER software (HEKA Instrument Inc., New York, USA). The signals were digitized at 1 kHz. Whole-cell recordings were corrected for a junction potential of +18 mV. The series resistance was monitored throughout the experiment using a brief voltage step of -10 mV at the end of each recording. In total, 23 neurons were patched (from $n = 5$ cultures from 5 independent rat embryos) but only 15 neurons had an analyzable action potential (AP).

Data analysis

Cell-attached

We performed cell-attached patch-clamp recordings to record the spontaneous firing activity of isolated enteric neurons while preserving the cytoplasmic contents. Cell-attached recordings were performed exclusively in the voltage-clamp mode, taking care to tune the injected current to 0 pA for 5 min (Perkins, 2006). The firing frequencies (Fi) were averaged from 10 continuous recordings (at least 2 min of continuous recordings) from each neuron.

Whole-cell patch clamp

Current-clamp: we applied progressive current injections, from a basal current of -150 pA, and increased by 500 ms steps of 10 pA at 0.1 Hz, until AP firing. We analyzed action potential parameter recordings following a current injection of +30 pA above rheobasis. We measured the I/V relationship and active membrane properties using Fitmaster (HEKA Elektronik, Germany): membrane potential, amplitude of action potential, rise and decay time duration, amplitude of hyperpolarization, duration to reach hyperpolarization amplitude, and frequency of action potential.

Voltage-clamp: Neurons were then voltage clamped at -60 mV, and the miniature post-synaptic currents (mPSCs) were recorded and analyzed during 250 s recording segments. We identified the (mPSCs) using a semi-automated amplitude threshold-based detection software (Mini Analysis 6.0.7 Program, Synaptosoft, Fort Lee, NJ, USA).

Multi-electrode array electrophysiology

We performed MEA recordings using the MEA2100-Mini-System (MultiChannel Systems), which includes the signal collector unit USB-ME64-system equipped with a FA60SBC filter amplifier (total gain = 1,100), a power supply (PS40W), and a temperature controller (TC02). Standard 60-electrode MEA chips (60MEA200/30iR-Ti) were pre-coated with 0.1 mg/ml of poly-L-lysine and 0.1 mg/ml poly-L-ornithine overnight at room temperature. After rinsing the chips, enteric neurons were plated onto the MEA chips and maintained for 28 days in an incubator at 37°C and 5% CO_2 before recording. During recordings (10 min per MEA chip), plates were kept

on a heated stage maintained at 37°C and covered with a plate lid to prevent evaporation of the medium. Spontaneous network activity from rat enteric neuron cultures on MEA chips was acquired using the MultiChannel Experimenter software (version 2.17.8.21078). We analyzed the data using a MultiChannel Analyzer (version 2.18.0.21200). The recordings were digitized at 50 kHz. During offline analysis, a digital 2nd order high pass Bessel filter with a cutoff of 100 Hz was applied. The peak detection threshold was set with an average noise of five times the signal standard deviation on a per-channel basis (dead time of 3 ms, pre-trigger of 1 ms, and post-trigger of 2 ms). Bursts were analyzed using the following parameters: maximum interval of 50 ms to start/end the burst, minimum interval of 100 ms between bursts, minimum burst duration of 50 ms, and at least four spikes in a burst. Data are presented as mean \pm SEM of $n = 3$ chips from 3 independent rat embryos.

Statistical analysis

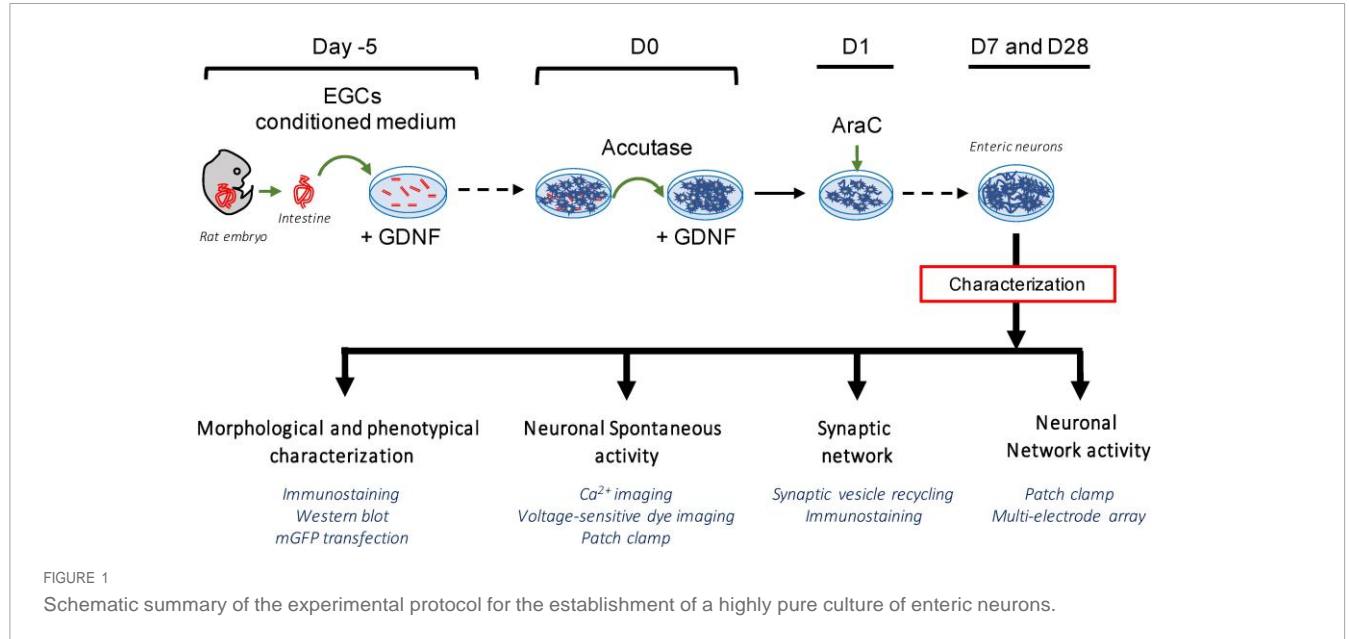
All data are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of the Mean). Normality and equal variance were verified using the Shapiro–Wilk and Brown–Forsythe tests, respectively. Data were then compared using a t-test or one-way analysis of variance (ANOVAs), followed by *post-hoc* Tukey’s comparison test. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Establishment of a highly pure neuron culture

The establishment of a highly pure culture of enteric neurons was based on a novel two-step protocol applied to rat E15 embryos as summarized in **Figure 1**. First, the gut explants were cultured for 5 days (D-5 to D0), and the cells that migrated from the gut explant recovered by mild accutase treatment on D0 and plated in a culture dish for seven additional days to obtain a dense neuronal network at D7 (**Figure 1**).

Besides neurons, other putative cell types derived from gut explants could be EGCs and muscle cells. To determine the proportion of each cell type, we performed triple immunolabeling for Hu, S100 β , and α -SMA to specifically label neurons, EGCs, and muscle cells, respectively (**Figure 2A**). At D7, $99.7 \pm 0.14\%$ of total cells (identified using DAPI staining) were neurons [Hu-immunoreactive (IR)], $0.25 \pm 0.15\%$ were muscle cells (α -SMA-IR) and only $0.05 \pm 0.02\%$ were EGCs (S100 β -IR) (neurons vs. muscle cells: $p < 0.001$; neurons vs. EGCs: $p < 0.001$, $n = 4$ culture wells from four independent



rat embryos, Kruskal–Wallis) (Figure 2B). Neurons are mainly organized as clusters composed of 5–8 neuronal cell bodies. To further confirm the purity of neurons in our culture model, we performed Western blot (WB) using antibodies against the neuronal proteins Tuj1 and PGP 9.5, the glial protein GFAP, and the muscle cell protein α -SMA. As a control, ENS mixed cultures were also analyzed by WB with the same markers (Figure 2C). We only detected Tuj1 and PGP 9.5 expression in our neuron culture model, while the markers of all the cell types were observed in the ENS mixed culture (Figure 2C). Regarding the network organization, neuronal cell bodies were present at high density and showed a profuse network of nerve processes (Figure 2D). These were later characterized as axons when labeled with Tuj1 and PGP 9.5, respectively (Figures 2D, E), and as dendrites when labeled with MAP2 (Figure 2E). These results show that the experimental design developed in this study resulted in a primary culture model composed of neurons.

Morphological and phenotypical characterization of enteric neurons

Several subtypes of enteric neurons have been identified, based on their morphology and neurochemical phenotypes. The morphological criteria concern the size of the cell body, presence of dendrites, and axonal architecture. To assess the morphology of enteric neurons in our culture model, we transfected cells with an mGFP plasmid on D0 and analyzed their morphology on D3. We found a mean of 183.60 ± 18.25 neurons expressing mGFP in a 48-well culture plate, corresponding to a transfection rate of $0.26 \pm 0.03\%$. This small fraction of transfected neurons enabled the visualization of the entire morphology of a single

neuron in a dense neuronal network (Figure 3). Three distinct morphological classes of transfected neurons were observed. The first class describes monoaxonal neurons with a small cell body diameter ($\sim 20 \mu\text{m}$) (Figures 3A, B). This first class, predominant, represent $94.7 \pm 0.9\%$ of transfected neurons and can be divided in 2 sub-types. Thus, we distinguish neurons with a long axonal process with sparse and short ramifications (Figure 3A) or a medium-length axon with numerous ramifications along the axonal process (Figure 3B).

The second class ($2.5 \pm 0.5\%$ of transfected neurons) is composed of multiaxonal neurons characterized by >2 axons of medium to short length and a large-diameter cell body ($40\text{--}45 \mu\text{m}$) (Figure 3C). Finally, a third and intermediate class was observed, with neurons exhibiting two axons and a small-diameter cell body ($\sim 20 \mu\text{m}$) ($2.8 \pm 0.5\%$ of transfected neurons) ($n = 6$ culture wells from 3 independent rat embryos). Interestingly, the first two morphological classes described above are reminiscent of types I and II of Dogiel's classification of enteric neurons, respectively. In addition, the morphological analysis of the dendrites showed that at D3, $23.2 \pm 4.5\%$ of them had a lamellar morphology (Figure 3D), $52.1 \pm 5.5\%$ a filamentous morphology (Figure 3E), and $24.7 \pm 1.7\%$ a combination of both morphologies ($n = 3$ culture wells from 3 independent rat embryos).

Based on neurochemical criteria, the most represented neurons in the ENS are nitrergic and cholinergic neurons. To assess the neurochemical phenotype of enteric neurons in highly pure culture, cells were immunolabelled for nNOS and ChAT to identify nitrergic (Figure 3F) and cholinergic (Figure 3G) neurons, respectively. We found that $20.3 \pm 2.6\%$ of total neurons, as determined by Hu staining, were nNOS-positive neurons and $17 \pm 1.9\%$ were ChAT-positive neurons (Figure 3H).

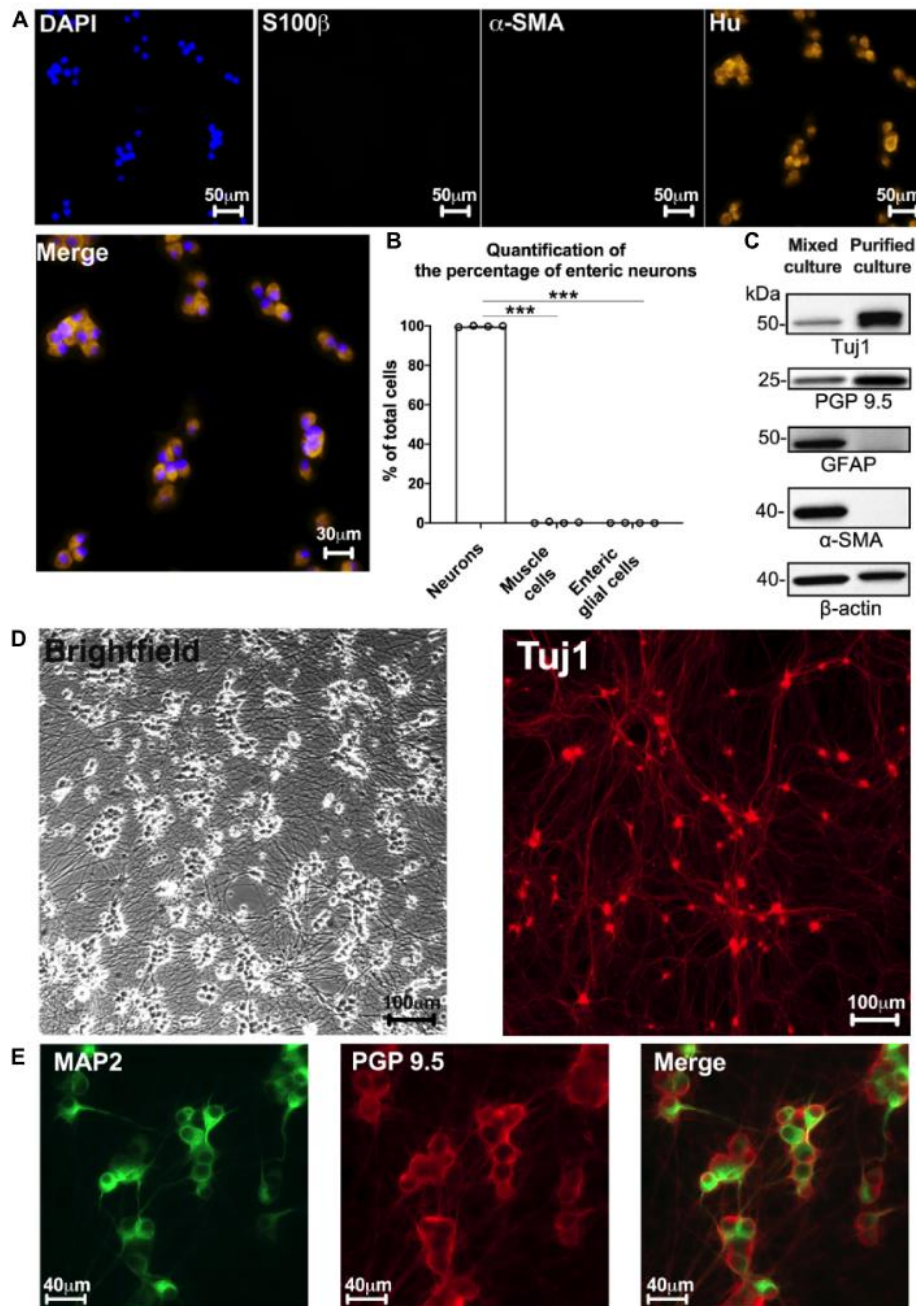


FIGURE 2

Highly pure culture of rat enteric neurons. (A) Staining for cell nucleus (DAPI) and immunostaining for enteric neurons (Hu), glial cells (S100b), and myofibroblasts (α -SMA) at D7 culture. (B) Quantification of the percentage of enteric neurons, glial cells and myofibroblasts in cultures at D7 (Data are presented as mean \pm SEM from 644 neurons analyzed from $n = 4$ culture wells from 4 independent rat embryos). (C) Representative western blot from ENS mixed cell culture (muscle, glia, and neuronal cells) and highly pure culture of enteric neurons ($n = 4$ culture wells from 4 independent rat embryos). (D) Brightfield and immunostaining for TUJ1 in culture at D7. (E) Double immunostaining of enteric neurons at D7 with the somatodendritic marker MAP2 (green) and PGP 9.5 (red) ($n = 3$ culture wells from 3 independent rat embryos). Results were compared using one-way ANOVA and *post-hoc* Tukey's test ($***p < 0.001$).

Taken together, these results indicate that our culture model is composed of cells with morphological and phenotypic characteristics of enteric neurons.

Functional characterization of enteric neurons

One of the fundamental features of neurons is to be electrically excitable cells with the ability to produce APs.

To determine the electrophysiological characteristics of APs generated by highly pure enteric neuron cultures, we performed whole-cell patch clamp recordings (Figures 4A, B). The data obtained on the active and passive membrane properties of neurons are detailed in Table 1 and Figures 4A, B. The electrophysiological data showed that the APs of enteric neurons have on average a rheobase of 37.7 ± 5.9 pA, a threshold of -25.1 ± 1.6 mV, an amplitude of 45.7 ± 3.0 mV, and a duration of 6.9 ± 0.7 ms. In addition, a break in the linearity

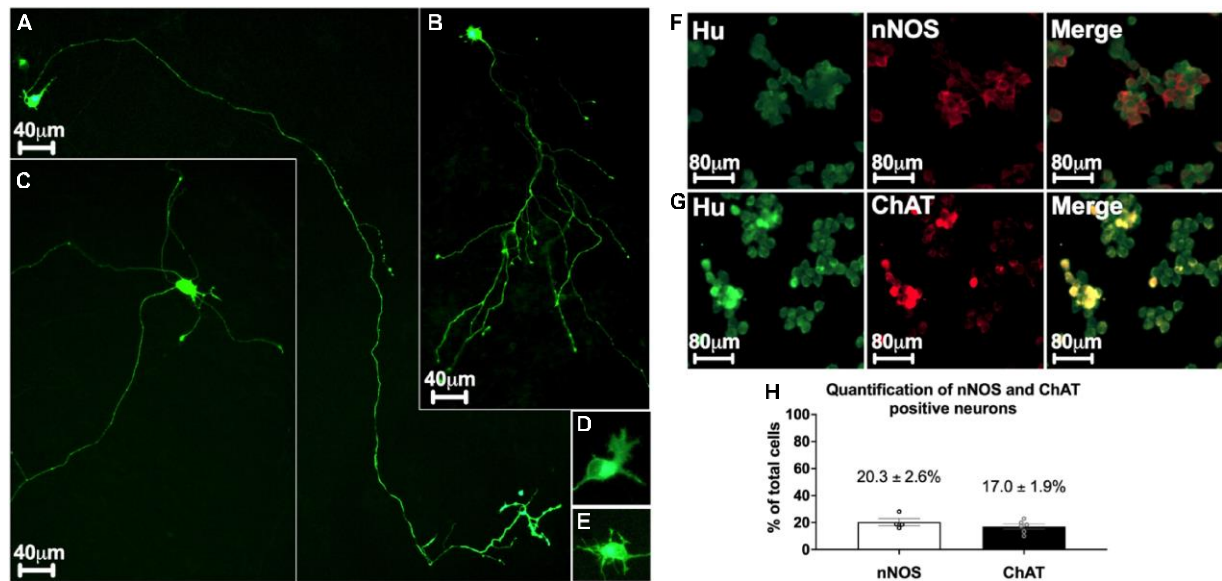


FIGURE 3
Morphological and phenotypical characterization of enteric neurons. (A–E) mGFP transfected enteric neurons at D3. (A,B) Monoaxonal enteric neurons with a small-diameter cell body. Monoaxonal neurons can be sorted into two sub-types based on axon morphology: long axonal process with sparse and short ramifications (A) or medium-length axon with numerous ramifications (B). (C) Multiaxonal neurons exhibiting more than 2 axons of medium to short length and a large-diameter cell body (183 neurons analyzed from $n = 4$ culture wells from 4 independent rat embryos). (D,E) Neuron with lamellar (D) and filamentous (E) dendrites (110 neurons analyzed from $n = 3$ culture wells from 3 independent rat embryos). (F,G) Double immunostaining of enteric neurons with the neuronal cell body marker Hu (green) with either nNOS (red, F) or ChAT (red, G) at D7. (H) Percentage of neurons immunostained with neuronal nNOS and ChAT at day 7. Data are presented as mean \pm SEM from 886 neurons analyzed from $n = 4$ culture wells from 4 independent rat embryos.

of the I/V curve, represented by the linear regression line, was observed after depolarization (Figure 4B). This result suggests outward rectification corresponding to the filtration of the input information.

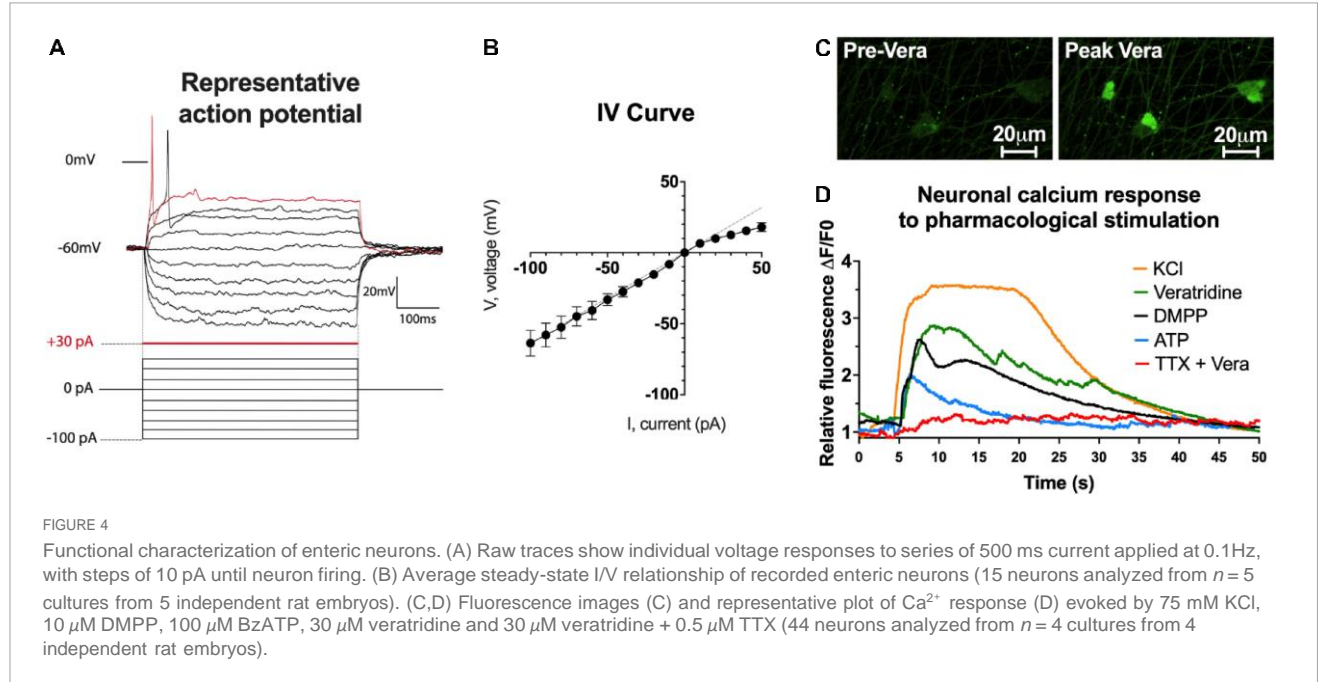
Next, the ability of enteric neurons to respond to ion channel activators and neurotransmitter receptor agonists was investigated at D7 using Ca^{2+} imaging based on the Ca^{2+} probe Cal520-AM (Figures 4C, D). The addition of veratridine (30 μ M), an activator of voltage-dependent Na^+ channels, induced a progressive and high increase in intracellular Ca^{2+} , which remained at a high level for 35 s of recording with a percentage of responding cells of $87.5 \pm 7.9\%$ (Figures 4C, D). Pre-treatment with the voltage-dependent Na^+ channel blocker TTX (0.5 μ M) prevented veratridine-induced response (Figure 4D). Depolarization induced by KCl (75 mM) resulted in a rapid and elevated intracellular Ca^{2+} response on $97.2 \pm 2.8\%$ of neurons (Figure 4D). Regarding the activation of neurotransmitter receptors, the nicotinic cholinergic receptor agonist DMPP (10 μ M) and the purinergic receptor agonist BzATP (100 μ M) induced a rapid and transient increase in the intracellular Ca^{2+} response with $63.5 \pm 10.4\%$ and $48.5 \pm 12.5\%$ neurons responding to pharmacological stimulation, respectively (Figure 4D). These data suggest that enteric neurons in culture are sensitive to activation/inhibition of voltage-dependent Na^+ channels and depolarization, and that they express functional cholinergic and purinergic receptors.

Activity of enteric neurons within the network

The establishment of a functional neuronal network is characterized by the spontaneous activity of the neurons. This neuronal activity can be measured by Ca^{2+} imaging through the analysis of spontaneous Ca^{2+} transients, as previously described (Boesmans et al., 2008; Margiotta et al., 2021). Here, we assessed the ability of enteric neurons at D7 to generate spontaneous intracellular calcium transients using Ca^{2+} imaging. We found that cultured enteric neurons exhibited spontaneous activity in the cell body, with an average calcium transient frequency of 0.88 ± 0.15 Hz (Figures 5A, B). In addition, several Ca^{2+} transient patterns were observed, with isolated (1), moderately clustered (2), and tightly clustered transients (3) (Figure 5B).

Spontaneous electrical activity was also studied using cell-attached patch clamp on neuronal cell bodies (Figure 5C). The results showed that 65% of the neurons exhibited a spontaneous activity with an average AP frequency of 0.15 ± 0.04 Hz (Figure 5C).

Finally, to assess spontaneous activity at the level of the neuronal fiber network, we used a voltage-sensitive probe approach with FluoVolt™ dye. Using VSD imaging, enteric neurons showed the ability to generate spontaneous spikes, which are present along the fibers, with an average frequency



of 0.19 ± 0.05 Hz (Figures 5D, E). Moreover, depending on the size of the fibers analyzed, we were able to obtain either isolated spikes on small-caliber fibers (1) or compound potentials (composed of several spikes) on large-caliber fibers (2) (Figures 5D, E).

The observation of spontaneous activity of enteric neurons measured on cell bodies and nerve fibers suggests the existence of connectivity between enteric neurons operating through neuronal cell bodies and fiber network.

Synaptic connectivity of enteric neurons

To further study the properties of enteric neuron connectivity within the network, the presence of synapses was first assessed at D7 by immunofluorescence with the pre- and post-synaptic markers synapsin-1 and PSD95, respectively (Figures 6A, B). Synapsin-1 was distributed in clusters around the neuronal perikarya and along the axonal extensions (Figure 6A). The post-synaptic protein PSD95 was detected as clusters in neuronal cell bodies and throughout the fibers in proximity to neuronal cell bodies (Figure 6A). To further analyze the spatial relationships between synapsin1 and PSD95, we performed confocal microscopy imaging with 3D reconstruction and quantified the number of apposed synapsin1 and PSD95 clusters (Figure 6B). We found that approximately $33 \pm 10\%$ of total synapsin1 clusters were apposed to PSD95 clusters, suggesting that a fraction of synapses formed between enteric neurons contain synapsin 1 and PSD95 as pre- and post-synaptic proteins, respectively.

To assess the functionality of the synapses previously revealed with synaptic markers synapsin-1 and PSD95, labeling of synaptic vesicle endo/exocytosis recycling was performed by FM1-43 imaging (Figures 6C–E). Enteric neurons were exposed to FM1-43 dye while stimulated by depolarization with the stimulation buffer (KCl 75 mM) to allow FM1-43 loading by endocytosis. After washout of excess dye with washing buffer, active synaptic clusters appeared as bright red fluorescent spots throughout the neuronal network (Figure 6C). After stimulation with the stimulation buffer, synaptic vesicle exocytosis was assessed by measuring the remaining FM1-43 fluorescence intensity at 1min (Figures 6D, E). We observed

TABLE 1 Summary of passive and active membrane properties of enteric neurons recorded in whole-cell patch clamp configuration.

Action potential (AP) properties			
	MEAN	SEM	N
Ri steady state (Go)	662.85	76.65	15
Rheobase (pA)	37.66	5.91	15
AP threshold (mV)	-25.13	1.57	15
AP delay (ms)	78.90	20.16	15
AP amplitude (mV)	45.68	2.98	15
AP rise (ms)	3.16	0.38	15
AP decay (ms)	3.74	0.31	15
AP duration (ms)	6.91	0.66	15
fAHP duration (ms)	10.20	1.34	15
fAHP amplitude (mV)	-20.36	1.33	15
sAHP duration (ms)	110.23	21.41	15

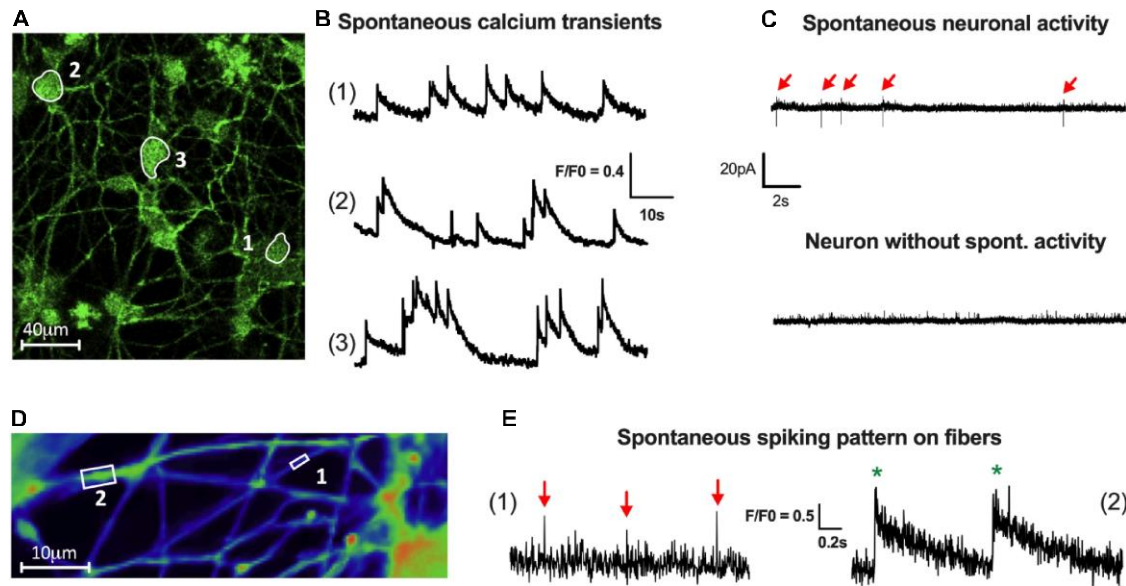


FIGURE 5

Activity of enteric neurons within the network. (A,B) Fluorescence images (A) of a field containing neuronal cell bodies with spontaneous activity (1, 2 and 3). (B) Representative traces of three types of spontaneous Ca^{2+} activity defined as isolated (1), moderately clustered (2) and tightly clustered transients (3) (70 neurons analyzed from $n = 4$ cultures from 4 independent rat embryos). (C) Representative traces of spontaneous spiking pattern in patch clamp cell-attached configuration (15 neurons analyzed from $n = 5$ cultures from 5 independent rat embryos). (D) Fluorescence images of a field containing neuronal fibers of small (boxed region 1) and large (boxed region 2) caliber with spontaneous activity visualized by VSD imaging. (E) Representative traces of isolated spikes (red arrow) on small caliber fibers (1) or compound potentials (green*), composed of several spikes, on large caliber fibers (2) (15 fibers analyzed from $n = 4$ cultures from 4 independent rat embryos).

three types of synaptic clusters according to the fraction of FM1-43 remaining fluorescence as measured at 1 min. The first type was defined by synaptic clusters retaining a high level

of fluorescence intensity ($\geq 80\%$ of cluster's intensity at t_0) corresponding to clusters with low level of synaptic vesicle release activity (Figures 6D, E cluster 1). The second type was defined by synaptic clusters retaining a low level of fluorescence intensity ($\leq 50\%$) corresponding to clusters with high level of synaptic vesicle release activity (Figures 6D, E cluster 2).

The last type was defined by synaptic clusters retaining an intermediate level of fluorescence intensity (comprised between 80% and 50%) corresponding to clusters with intermediate level of synaptic vesicle release activity (Figures 6D, E cluster 3). These three types of synaptic clusters represent respectively, $42.7 \pm 19.6\%$, $15.1 \pm 15.1\%$, and $42.2 \pm 4.9\%$ of analyzed synaptic clusters (154 clusters were analyzed from $n = 3$ culture wells from three independent rat embryos). These results show the presence of functional synaptic sites in our culture model of highly pure enteric neurons.

Next, to study the functional synaptic connectivity of cultured neurons, patch clamp was performed as a whole-cell configuration to measure miniature post-synaptic currents (mPSCs) at D7 (Figures 6F, G). mPSCs correspond to small currents measured in post-synaptic neurons that have been induced by the release of synaptic vesicles from presynaptic terminals. We found that 60% of neurons spontaneously received mPSCs from other neurons. The measured mPSCs

showed an average frequency of 2.18 ± 0.41 Hz and an amplitude of 9.25 ± 1.10 pA. The properties of the mPSCs are listed in Table 2. These data indicate that highly pure enteric neurons in culture establish a functional synaptic connectivity.

The neuronal enteric network activity

To study the neuronal network activity, we applied the MEA approach to our culture model. The spontaneous activity of the neuronal network was studied at D28 by measuring the field potentials with 60 electrodes on a multi-electrode array chip (Figure 7). First, our results showed that enteric neurons cultured on the MEA chip developed similarly to those in a regular culture plate and were maintained for 28 days of culture. Enteric neurons were grouped into clusters and expressed dendritic (MAP2) and neuronal (PGP9.5) markers (Figures 7A, B).

The study of electrical activity by MEA showed the presence of spontaneous spikes on all 59 electrodes (excluding ref. electrode). For the rest of the analysis, we only considered the most responsive electrodes, defined by at least 6 spikes per minute, which represented an average of 15.3 ± 1.45 electrodes per chip. To investigate whether the spikes originated from neuronal activity, we used TTX to block voltage-dependent Na^+ channel activity. Before TTX, the number of spikes per minute was 36.2 ± 13.8 on the 15 selected

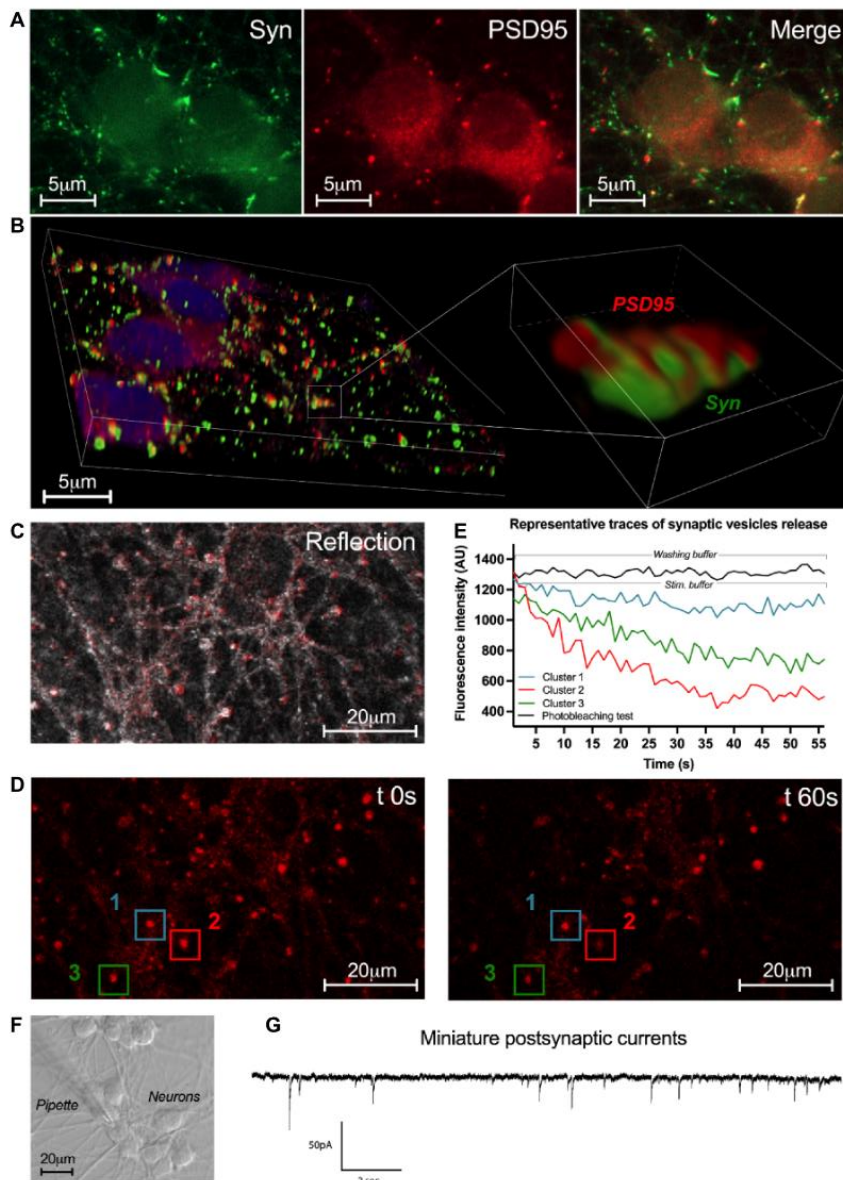


FIGURE 6

Synaptic network activity of enteric neurons at D7 with the pre-synaptic marker synapsin I (Syn; green) and the post-synaptic marker PSD95 (red) ($n = 3$ culture wells from 3 independent rat embryos). (B) 3D reconstructed confocal microscopy images of cultured neurons immunolabeled for synapsin 1 (green) and PSD95 (red) with a higher magnification of the boxed region. (C) Representative image of the enteric neuron culture in reflection microscopy. (D) Fluorescence images of a field containing clusters measured at $t 0s$ and $t 60s$ after KCl stimulation. (E) Plot of FM1-43 fluorescence intensity analyzed from a representative cluster recorded in washing buffer and 3 representative clusters recorded in stimulation buffer of the enteric neuron culture at D7 (154 clusters analyzed from $n = 3$ culture wells from 3 independent rat embryos). (F) Representative image of enteric neurons in light microscopy and the patch clamp pipette used for the whole-cell configuration. (G) Representative trace of miniature post-synaptic currents (mPSCs) recorded from enteric neurons at D7 (10 neurons analyzed from $n = 5$ culture wells from 5 independent rat embryos).

electrodes (Figures 7C, D). The addition of TTX to the culture medium significantly reduced the number of spikes per minute to 1.9 ± 0.2 ($p < 0.05$) (Figures 7C, D). Detailed analysis of the spikes indicated that the spike amplitude is approximately $40 \mu V$, with a duration of approximately

1 ms (Figure 7E). The distribution of the inter-spike interval (ISI), that is, the time that elapses between two spikes, was mostly between 10 and 50 ms (Figure 7F). Finally, we measured burst firing, defined by a pattern of grouped spikes followed by rest periods much longer than the ISI. The

TABLE 2 Summary of miniature post-synaptic currents properties of enteric neurons recorded in whole-cell patch clamp configuration.

Miniature post-synaptic currents			
	MEAN	SEM	N
Frequency (Hz)	2.18	0.41	10
Amplitude (pA)	9.25	1.10	10
Rise (ms)	6.24	0.23	10
Decay (ms)	25.23	1.38	10
10–90 Rise (ms)	4.76	0.23	10
Half Width (ms)	4.36	1.04	10
Rise 50 (ms)	1.54	0.21	10
10–90 Slope	−3.03	0.71	10

data showed that the number of bursts per minute was on average 2.63 ± 0.38 with a duration of 89.97 ± 9.80 ms (Figures 7G–K). In addition, the average of the inter-burst interval was 26.09 ± 8.86 s (Figure 7J). Interestingly, addition of TTX to the medium inhibited the occurrence of bursts (Figures 7G–J). Finally, the burst network analyses did not show any burst synchronization at D28. Spontaneous activity measured by MEA showed the presence of spikes and bursts suggesting the establishment of a functional enteric neuronal network in culture.

Discussion

In this study, we showed that highly pure primary culture of enteric neurons could be obtained from the guts of rat embryos. The implemented protocol resulted in approximately 99.7% purity for enteric neurons, with minimal contribution from muscle cells and virtually no enteric glial cells. We found morphological and phenotypic diversity characteristics of enteric neurons and demonstrated their functionality using several approaches. Electrical excitability and spontaneous neuronal activity were demonstrated using the patch-clamp, VSD, and Ca^{2+} imaging. Furthermore, these highly pure enteric neuronal cultures were able to establish functional synaptic connectivity, as assessed at the single-cell level by patch clamp, and a functional neuronal network, as assessed by MEA. This novel enteric neuron culture model provides a valuable tool for studies targeting cell-autonomous mechanisms involved in the establishment and maintenance of enteric neuron connectivity.

We present a culture model of enteric neurons whose main feature is composed of more than 99% of neurons as early as 7 days of culture, which can be maintained for long-term studies up to a month. Neuronal enrichment was achieved using a protocol based on the three main experimental elements. First, the addition of GDNF to the day of gut explant and dissociated cell seeding is critical for promoting neuronal cell differentiation and survival. Second, the use of glia-conditioned neurobasal

medium also supported neuronal enrichment, in accordance with the reported role of EGC in neuroprotection (Abdo et al., 2010) and neuronal maturation of enteric neurons (Le Berre-Scoul et al., 2017). Third, the use of the antimetabolic agent AraC, which is known to inhibit cell proliferation, contributed to the elimination of muscle and enteric glial cells. Most current culture models with enteric neurons are primary cultures of dissociated cells derived from embryonic or adult intestines (Saffrey et al., 1991; Hanani et al., 1994; Heuckeroth et al., 1998; Fex Svenningsen et al., 2003; Chevalier et al., 2008; Gomes et al., 2009; Schonkeren et al., 2022) and organotypic cultures of gut explants (Jessen et al., 1983; Natarajan et al., 1999), in which enteric neurons are in the minority among EGCs, smooth muscle cells, fibroblasts, and epithelial cells. This cellular diversity, which recapitulates, in part, the intestinal cellular microenvironment, makes it extremely difficult to study the intrinsic properties of enteric neurons and their ability to directly respond to various stimuli, including gut cell-derived factors. To circumvent this pitfall, several methodologies have been developed in an attempt to enrich gut-derived cultures with enteric neurons; however, isolation and culture of primary enteric neurons is a difficult process and has yielded only a small number of neurons. Myenteric ganglion explants from newborn guinea pigs subjected to antimetabolic agent and antibody complement-mediated cytolysis resulted in the elimination of glial cells and therefore enrichment in enteric neurons, but with low yield and a sparse neuronal network (Bannerman et al., 1988). In addition, based on the use of antimetabolic compounds, we previously developed a neuron-enriched primary culture from rat embryonic intestines, grown as an indirect co-culture with enteric glial cells (Le Berre-Scoul et al., 2017). Other procedures have used immunoselection of p75NTR-positive cells to isolate neuronal precursors from embryonic and postnatal intestinal tissues (Wu et al., 1999; Anitha et al., 2008; Sato and Heuckeroth, 2008; Gisser et al., 2013; Hawkins et al., 2013). However, all the aforementioned methodologies are relatively complex, often resulting in a sparse neuronal network, and in some cases, leading to neurons with deficient electrical excitability or to cultures containing muscle cells after several days in culture. The methodology described in this study resulted in a primary culture model highly enriched in enteric neurons with a functional neuronal network and was achieved through a relatively simple procedure. This novel model represents an innovative tool for deciphering the cell-autonomous mechanisms or pathways involved in the formation and functionality of enteric neuron networks. Moreover, it offers the possibility to establish multi-compartment systems combining highly pure enteric neurons with other pure gut cell cultures, such as epithelial, glial or muscle cells, to study functional interplay between enteric neurons and other cell types.

The implementation of this enteric neuron culture model has led to significant technological advances. First, we provided

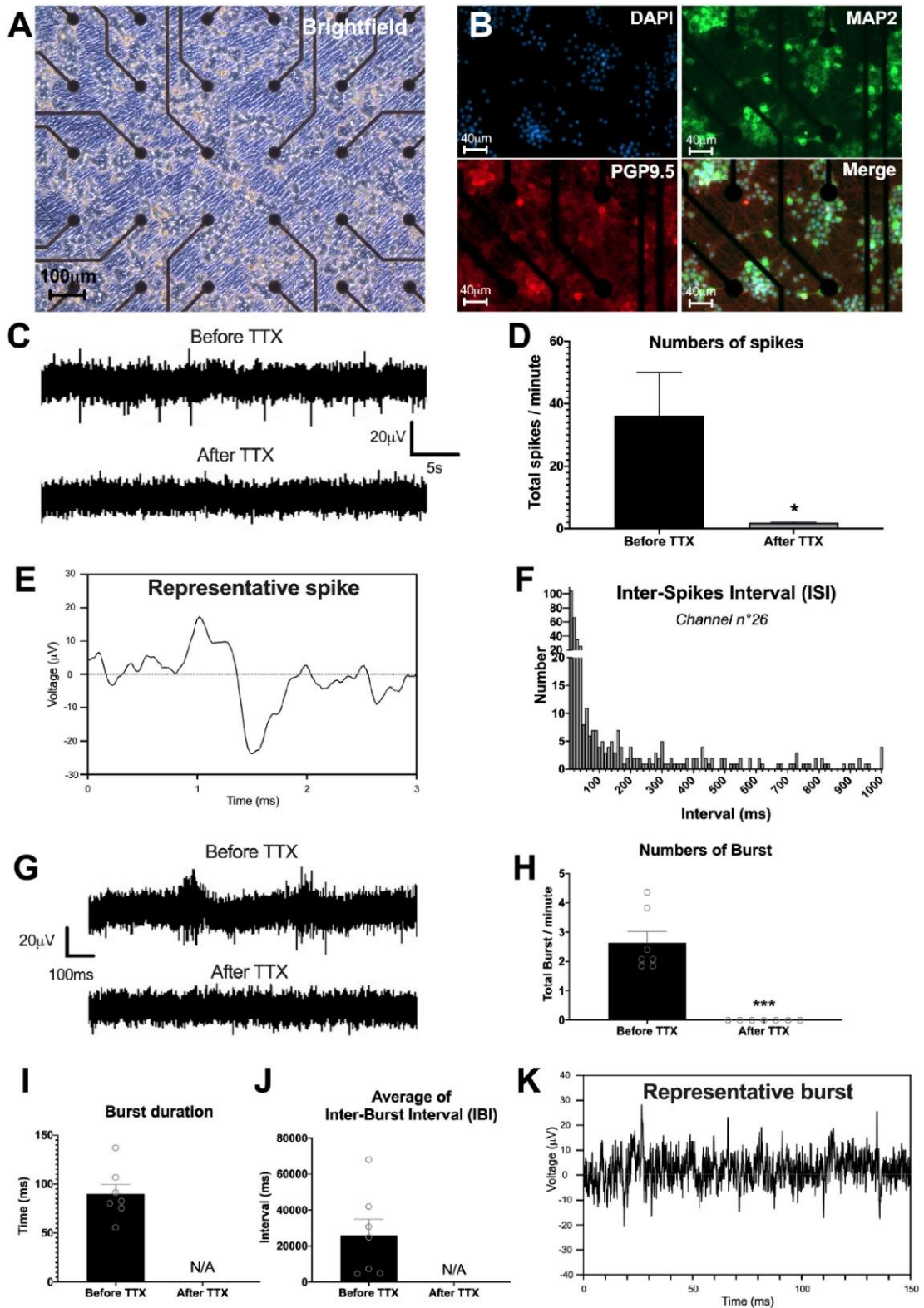


FIGURE 7

Enteric neuronal network activity. (A–K) Analysis of neural network activity of highly pure cultures of enteric neurons by multi-electrode array (MEA) at D28. (A,B) Representative image of enteric neurons in MEA, (A) brightfield and (B) double immunostaining of enteric neurons at D28 with neuronal marker PGP 9.5 (red), MAP2 (green) and the cell nucleus marker DAPI (blue). (C) Representative voltage recording at one electrode, showing spontaneous firing and its inhibition by TTX treatment. (D) Numbers of spikes per minutes before and after TTX, average of 15 electrodes. (E) Detail of a representative enteric neuron spike measured by MEA. (F) Histogram representing an example of Inter-Spike Interval (ISI) measured on one electrode ($n = 26$). (G) Single electrode recordings showing examples representative traces of two consecutive burst before and after TTX treatment. (H–J) Different parameters of burst measured by MEA before and after addition of TTX in the culture, i.e., (H) numbers, (I) duration, and (J) average of inter-burst interval. (K) Detail of a representative burst trace measured by MEA. Results were compared using t-test ($*p < 0.05$; $***p < 0.001$). Data are presented as mean \pm SEM of $n = 3$ chips from 3 independent rat embryos.

evidence that lipid-mediated transfection can be achieved in cultured enteric neurons. Although the efficiency of the lipofection methodology used in this study is low, as previously reported for central neurons (Karra and Dahm, 2010), it offers the advantages of being technically simple and requiring regular plasmid vectors without the need to generate virus-based constructs. This lipofection-based approach opens up novel strategies to study the impact of any selected protein on enteric neuron activity and connectivity. Another technical contribution of this novel model of cultured enteric neurons is its applicability to MEA. Multi-electrode array allows simultaneous monitoring of the electrophysiological activity of neuronal circuits at many sites through non-invasive (i.e., extracellular) methods and, therefore, to document the functional properties of neuronal networks. This technique requires pure neuronal culture because the presence of other cell types, such as muscle cells, can prevent contact between the MEA chip electrodes and the cultured neurons, and therefore reduce or interfere with the recorded electrical signal. The enteric neuron culture model developed in this study enables the use of MEA, thus providing a novel functional approach of characterizing neuronal network activity.

We provided morphological and functional evidence that enteric neurons obtained by the methodology described in this study possess properties relevant to physiological conditions. First, morphological analyses of GFP-transfected neurons revealed morphological characteristics reminiscent of Dogiel type I and II neurons, the two main classes of enteric neurons widely described in rats, mice, and the human gastrointestinal tract during postnatal development and adulthood (Cornelissen et al., 1999; Nurgali et al., 2004; Brehmer, 2021). In addition, the neurochemical coding analyses indicated that 17 and 20% of the cultured neurons were cholinergic and nitrergic neurons, respectively. These results are similar to those previously described in other ENS culture models (Le Berre-Scoulet et al., 2017; Aubert et al., 2019) and in the colons of young or adolescent rats and mice (Aubert et al., 2019; Parathan et al., 2020), but is lower than the proportions of cholinergic and nitrergic neurons described in adult rodents (Soret et al., 2010). A time-dependent increase in the percentage of cholinergic and nitrergic neurons have been described during the postnatal development in rat colons (de Vries et al., 2010). Thus, our enteric neuron culture model, as well as other ENS culture models, likely represent dynamic systems during development rather than adult stage models. We also showed that cultured neurons are responsive to cholinergic and purinergic agonist stimulation, indicating that they express functional neuroreceptors. They were also able to display spontaneous neuronal activity, as measured by Ca^{2+} imaging, characterized by three major patterns of Ca^{2+} transients: isolated, moderately clustered, and tightly clustered transients, as previously observed in

mouse cholinergic myenteric ganglion neurons (Margiotta et al., 2021). The functional significance of these three Ca^{2+} transient patterns remain unknown but may underlie different neuronal subclasses and levels of activity. Interestingly, different neuronal activity patterns of cholinergic and nitrergic neurons, defined by spontaneous Ca^{2+} transients, have been correlated with the contraction and inhibition of the colon (Gould et al., 2019). Finally, we found that isolated enteric neurons were excitable, generating electrically induced and spontaneous APs, as shown by the patch-clamp technique and VSD imaging. Remarkably, the frequency of spontaneous AP measured by these two approaches was similar, suggesting that the same events could be detected by these two distinct methods. Furthermore, the electrophysiological AP properties determined by patch clamp display similar characteristics to those obtained in mixed cultures containing enteric neurons, enteric glial cells, and muscle cells (Bodin et al., 2021) and in short-term cultures of dissociated embryonic intestines (Hao et al., 2011, 2012), suggesting that the intrinsic electrical properties of enteric neurons are retained even without the physiological cellular microenvironment.

We demonstrated that cultured enteric neurons could establish synaptic connections and organize functional neuronal networks. The juxtaposition of the presynaptic marker synapsin I clusters to the post-synaptic molecule PSD95 clusters supports the existence of synapses composed of pre- and post-synaptic structures with distinct molecular profiles. Furthermore, using FM1-43, we showed the presence of active synapses that could be classified into three populations according to the fraction of FM1-43 destaining. Interestingly, two patterns of FM1-43 destaining were described in hippocampal synapses, as potential indicator of two distinct modes of exocytosis (Richards et al., 2005). Similarly, also enteric neurons show a stimulus-dependent diversity of their synaptic contacts (Vanden Berghe and Klingauf, 2007), which could explain why in our rat culture experiments different levels of synaptic destaining are observed. Functional synaptic connectivity was also demonstrated in mPSCs, characterized by patch clamp analyses, which showed features similar to those previously observed in mixed ENS cultures (Bodin et al., 2021). Neuronal network activity was also functionally addressed by MEA recordings, which showed spontaneous network activity patterns characterized by single spikes and bursting events. Both types of signals were abolished by TTX, indicating that they were driven by neuronal action potentials (Zhou et al., 2009; Roberts et al., 2019). Multi-electrode array recordings have never been performed directly to enteric neurons but have been used on ileal whole-muscle layer containing the myenteric plexus to measure the oscillating electrical activity (Taniguchi et al., 2013). In addition, MEA have been used on CNS-derived cultured neuronal networks, including cortex, hippocampus, and motor neurons, which showed profiles of spontaneous spiking and bursting

activity similar to those obtained in our enteric neuron model (Arnold et al., 2005; Wainger et al., 2014; Negri et al., 2020). Analyses of MEA recordings provided important information for studying the formation, organization, and maintenance of neuronal networks. In particular, bursts corresponding to a fast series of spikes generated by connected neurons are important markers of network formation and activity (Zeldenrust et al., 2018). Interestingly, within the GI tract, neuronal imaging associated with electrophysiology during rhythmic neurogenic motor activity in the mouse colon revealed that large populations of enteric neurons fire in coordinated and repetitive bursts, generating muscle contractions that underlie migrating motor complexes (Spencer et al., 2018). In addition, several recent studies have highlighted the importance of ENS network architecture and functional connectivity in the neurogenic control of patterned motor function of the GI tract (Sasselli et al., 2013; Li et al., 2019; Nestor-Kalinoski et al., 2022). Thus, the application of a highly pure enteric neuronal network culture model to MEA might represent a valuable novel tool to better understand the mechanisms underlying the neuronal network activity and information processing of the ENS.

Our results indicate that these highly pure cultures of enteric neurons exhibited spontaneous electrical activity, which might play a role in neuronal network formation. It has been shown in the CNS and ENS that early spontaneous electrical activity plays a crucial role in the initiation of various processes, such as neuronal differentiation and maturation, and axon growth and formation of synaptic connections (Borodinsky et al., 2012; Hao et al., 2013). Spontaneous neuronal activity was observed in mouse embryonic enteric neurons at E11.5, with an increase in activity until E18.5, followed by a decrease in activity in adulthood. Several channels might be involved, such as voltage-gated Na⁺ channels, N-type voltage-gated Ca²⁺ channels, and purinergic P2 receptors (Hao et al., 2011, 2012, 2017). Further studies are required to characterize the mechanisms and impact of spontaneous electrical activity on network formation in our culture model.

In conclusion, this study describes a novel *in vitro* model of enteric neurons in rats. A major innovation of this model is its high enteric neuronal purity, which can form a complex and functional network. Moreover, its applicability to MEA represents a novel approach for studying the cell-autonomous mechanisms involved in the establishment and maintenance of enteric neuron networks.

Data availability statement

The original contributions presented in this study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

This animal study was reviewed and approved by the French Standard Ethical Guidelines for Laboratory Animals (Approval number E44015).

Author contributions

MC and HB: conceptualization. MC, JM, SN, GL, VP, MN, and HB: methodology. MC, ML, AD-G-d-L, CL, and VP: investigation. MC and ML: visualization. GL, MN, and HB: supervision. MC, ML, AD-G-d-L, and HB: writing—original draft. MC, GL, VP, MN, and HB: writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the Enté autisme project funded by “la Région Pays de la Loire”, and the project ANR Microbioautism (ANR-19-CE14-0024). This work was also supported by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM) and by 3Brain with Massimo Grattarola Award 2021 obtained by MC.

Acknowledgments

We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), a member of the National Infrastructure France-Bioimaging, supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., et al. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J.* 24, 1082–1094. doi: 10.1096/fj.09-139519

Amin, H., Maccione, A., Marinaro, F., Zordan, S., Nieuw, T., and Berdondini, L. (2016). Electrical responses and spontaneous activity of human iPS-Derived neuronal networks characterized for 3-month culture with 4096-electrode arrays. *Front. Neurosci.* 10:121. doi: 10.3389/fnins.2016.00121

Anitha, M., Joseph, I., Ding, X., Torre, E. R., Sawchuk, M. A., Mwangi, S., et al. (2008). Characterization of fetal and postnatal enteric neuronal cell lines with improvement in intestinal neural function. *Gastroenterology* 134, 1424–1435. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.018

Arnold, F. J. L., Hofmann, F., Bengtson, C. P., Wittmann, M., Vanhoutte, P., and Bading, H. (2005). Microelectrode array recordings of cultured hippocampal neurons reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity. *J. Physiol.* 564, 3–19. doi: 10.1113/jphysiol.2004.077446

Aubert, P., Oleynikova, E., Rizvi, H., Ndjim, M., Le Berre-Scoul, C., Grohard, P. A., et al. (2019). Maternal protein restriction induces gastrointestinal dysfunction and enteric nervous system remodeling in rat offspring. *FASEB J.* 33, 770–781. doi: 10.1096/fj.201800079R

Bannerman, P. G., Mirsky, R., and Jessen, K. R. (1988). Establishment and properties of separate cultures of enteric neurons and enteric glia. *Brain Res.* 440, 99–108. doi: 10.1016/0006-8993(88)91162-6

Bodin, R., Paillé, V., Oullier, T., Durand, T., Aubert, P., Le Berre-Scoul, C., et al. (2021). The ephrin receptor EphB2 regulates the connectivity and activity of enteric neurons. *J. Biol. Chem.* 297:101300. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101300

Boesmans, W., Gomes, P., Janssens, J., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2008). Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut* 57, 314–322. doi: 10.1136/gut.2007.131839

Borodinsky, L. N., Belgacem, Y. H., and Swapna, I. (2012). Electrical activity as a developmental regulator in the formation of spinal cord circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 624–630. doi: 10.1016/j.conb.2012.02.004

Brehmer, A. (2021). Classification of human enteric neurons. *Histochem. Cell Biol.* 156, 95–108. doi: 10.1007/s00418-021-02002-y

Brookes, S. J. H. (2001). Retrograde tracing of enteric neuronal pathways. *Neurogastroenterol. Motil.* 13, 1–18. doi: 10.1046/j.1365-2982.2001.00235.x

Burns, A. J., and Pachnis, V. (2009). Development of the enteric nervous system: Bringing together cells, signals and genes. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 100–102. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01255.x

Burns, A. J., Roberts, R. R., Bornstein, J. C., and Young, H. M. (2009). Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Semin. Pediatr. Surg.* 18, 196–205. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2009.07.001

Chalazonitis, A., Tang, A. A., Shang, Y., Pham, T. D., Hsieh, I., Setlik, W., et al. (2011). Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates postnatal development of enteric dopaminergic neurons and glia via BMP signaling. *J. Neurosci.* 31, 13746–13757. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1078-11.2011

Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinar, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P., et al. (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J. Physiol.* 586, 1963–1975. doi: 10.1113/jphysiol.2007.149815

Cornelissen, W. B., de Laet, A. B., Kroese, A. B., Adriaensen, D. W., van Bogaert, P. P., Scheuermann, D. W., et al. (1999). Species-dependent features of Dogiel type II neurones in the mammalian enteric nervous system. *Eur. J. Morphol.* 37, 241–249. doi: 10.1076/ejom.37.4.241.4730

de Vries, P., Soret, R., Suply, E., Heloury, Y., and Neunlist, M. (2010). Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G539–G547. doi: 10.1152/ajpgi.00092.2010

Fex Svenningsen, A., Shan, W.-S., Colman, D. R., and Pedraza, L. (2003). Rapid method for culturing embryonic neuron-glia cell cocultures. *J. Neurosci. Res.* 72, 565–573. doi: 10.1002/jnr.10610

Foong, J. P. P., Nguyen, T. V., Furness, J. B., Bornstein, J. C., and Young, H. M. (2012). Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J. Physiol.* 590, 2375–2390. doi: 10.1113/jphysiol.2011.225938

Gershon, M. D. (2010). Developmental determinants of the independence and complexity of the enteric nervous system. *Trends Neurosci.* 33, 446–456. doi: 10.1016/j.tins.2010.06.002

Gisser, J. M., Cohen, A. R., Yin, H., and Garipey, C. E. (2013). A novel bidirectional interaction between endothelin-3 and retinoic acid in rat enteric nervous system precursors. *PLoS One* 8:e74311. doi: 10.1371/journal.pone.0074311

Gomes, P., Chevalier, J., Boesmans, W., Roosen, L., van den Abbeel, V., Neunlist, M., et al. (2009). ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 870–e862. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01302.x

Gonzales, J., Le Berre-Scoul, C., Dariel, A., Bréhéret, P., Neunlist, M., and Boudin, H. (2020). Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity and is inversely associated with synapsin 1 expression in Hirschsprung disease. *Sci. Rep.* 10:15119. doi: 10.1038/s41598-020-71865-3

Gougeon, P.-Y., Lourensen, S., Han, T. Y., Nair, D. G., Ropeleski, M. J., and Blennerhassett, M. G. (2013). The pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α are neurotrophic for enteric neurons. *J. Neurosci.* 33, 3339–3351. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3564-12.2013

Gould, T. W., Swope, W. A., Heredia, D. J., Corrigan, R. D., and Smith, T. K. (2019). Activity within specific enteric neurochemical subtypes is correlated with distinct patterns of gastrointestinal motility in the murine colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 317, G210–G221. doi: 10.1152/ajpgi.00252.2018

Hanani, M., Xia, Y., and Wood, J. D. (1994). Myenteric ganglia from the adult guinea-pig small-intestine in tissue-culture. *Neurogastroenterol. Motil.* 6, 103–118. doi: 10.1111/j.1365-2982.1994.tb00178.x

Hao, M. M., Bergner, A. J., Hirst, C. S., Stamp, L. A., Casagrande, F., Bornstein, J. C., et al. (2017). Spontaneous calcium waves in the developing enteric nervous system. *Dev. Biol.* 428, 74–87. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.05.018

Hao, M. M., Boesmans, W., Van den Abbeel, V., Jennings, E. A., Bornstein, J. C., Young, H. M., et al. (2011). Early emergence of neural activity in the developing mouse enteric nervous system. *J. Neurosci.* 31, 15352–15361. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3053-11.2011

Hao, M. M., Bornstein, J. C., Vanden Berghe, P., Lomax, A. E., Young, H. M., and Foong, J. P. P. (2013). The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system. *Dev. Biol.* 382, 365–374. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.12.006

Hao, M. M., Lomax, A. E., McKeown, S. J., Reid, C. A., Young, H. M., and Bornstein, J. C. (2012). Early development of electrical excitability in the mouse enteric nervous system. *J. Neurosci.* 32, 10949–10960. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1426-12.2012

Hao, M. M., and Young, H. M. (2009). Development of enteric neuron diversity. *J. Cell Mol. Med.* 13, 1193–1210. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00813.x

Hawkins, E. G., Dewey, W. L., Anitha, M., Srinivasan, S., Grider, J. R., and Akbarali, H. I. (2013). Electrophysiological characteristics of enteric neurons isolated from the immortal mouse. *Dig. Dis. Sci.* 58, 1516–1527. doi: 10.1007/s10620-013-2557-5

Heuckeroth, R. O., Lampe, P. A., Johnson, E. M., and Milbrandt, J. (1998). Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev. Biol.* 200, 116–129. doi: 10.1006/dbio.1998.8955

Holland, A. M., Bon-Frauches, A. C., Keszthelyi, D., Melotte, V., and Boesmans, W. (2021). The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology. *Cell Mol. Life Sci.* 78, 4713–4733. doi: 10.1007/s00018-021-03812-y

Jessen, K. R., Saffrey, M. J., and Burnstock, G. (1983). The enteric nervous system in tissue culture. I. Cell types and their interactions in explants of the myenteric and submucous plexuses from guinea pig, rabbit and rat. *Brain Res.* 262, 17–35. doi: 10.1016/0006-8993(83)90466-3

Kang, Y.-N., Fung, C., and Vanden Berghe, P. (2021). Gut innervation and enteric nervous system development: A spatial, temporal and molecular tour de force. *Development* 148:dev182543. doi: 10.1242/dev.182543

Karra, D., and Dahm, R. (2010). Transfection techniques for neuronal cells. *J. Neurosci.* 30, 6171–6177. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0183-10.2010

Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M., et al. (2017). A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J. Physiol.* 595, 583–598. doi: 10.1113/JP271989

Li, Z., Hao, M. M., Van den Haute, C., Baekelandt, V., Boesmans, W., and Vanden Berghe, P. (2019). Regional complexity in enteric neuron wiring reflects diversity of motility patterns in the mouse large intestine. *eLife* 8:e42914. doi: 10.7554/eLife.42914

Margiotta, J. F., Smith-Edwards, K. M., Nestor-Kalinowski, A., Davis, B. M., Albers, K. M., and Howard, M. J. (2021). Synaptic components, function and modulation characterized by GCaMP6f Ca²⁺ imaging in mouse cholinergic

- myenteric ganglion neurons. *Front. Physiol.* 12:652714. doi: 10.3389/fphys.2021.652714
- Moriyoshi, K., Richards, L. J., Akazawa, C., O'Leary, D. D., and Nakanishi, S. (1996). Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron* 16, 255–260. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80044-6
- Natarajan, D., Grigoriou, M., Marcos-Gutierrez, C. V., Atkins, C., and Pachnis, V. (1999). Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonising aganglionic bowel in organ culture. *Development* 126, 157–168. doi: 10.1242/dev.126.1.157
- Negri, J., Menon, V., and Young-Pearse, T. L. (2020). Assessment of spontaneous neuronal activity *in vitro* using multi-well multi-electrode arrays: Implications for assay development. *eNeuro* 7:ENEURO.0080-19.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0080-19.2019
- Nestor-Kalinowski, A., Smith-Edwards, K. M., Meerschaert, K., Margiotta, J. F., Rajwa, B., Davis, B. M., et al. (2022). Unique neural circuit connectivity of mouse proximal, middle, and distal colon defines regional colonic motor patterns. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 309–337.e3. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.08.016
- Nurgali, K., Stebbing, M. J., and Furness, J. B. (2004). Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *J. Comp. Neurol.* 468, 112–124. doi: 10.1002/cne.10948
- Parathan, P., Wang, Y., Leembruggen, A. J., Bornstein, J. C., and Foong, J. P. (2020). The enteric nervous system undergoes significant chemical and synaptic maturation during adolescence in mice. *Dev. Biol.* 458, 75–87. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.10.011
- Park, H.-J., and Friston, K. (2013). Structural and functional brain networks: From connections to cognition. *Science* 342:1238411. doi: 10.1126/science.1238411
- Perkins, K. L. (2006). Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J. Neurosci. Methods* 154, 1–18. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.02.010
- Ray, J., Peterson, D. A., Schinstine, M., and Gage, F. H. (1993). Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3602–3606. doi: 10.1073/pnas.90.8.3602
- Richards, D. A., Bai, J., and Chapman, E. R. (2005). Two modes of exocytosis at hippocampal synapses revealed by rate of FM1-43 efflux from individual vesicles. *J. Cell Biol.* 168, 929–939. doi: 10.1083/jcb.200407148
- Roberts, T. P., Kern, F. B., Fernando, C., Szathmáry, E., Husbands, P., Philippides, A. O., et al. (2019). Encoding temporal regularities and information copying in hippocampal circuits. *Sci. Rep.* 9:19036. doi: 10.1038/s41598-019-55395-1
- Saffrey, M. J., Bailey, D. J., and Burnstock, G. (1991). Growth of enteric neurones from isolated myenteric ganglia in dissociated cell culture. *Cell Tissue Res.* 265, 527–534. doi: 10.1007/BF00340876
- Sasselli, V., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., Tissir, F., Goffinet, A. M., and Pachnis, V. (2013). Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *J. Clin. Invest.* 123, 1763–1772. doi: 10.1172/JCI66759
- Sato, Y., and Heuckeroth, R. O. (2008). Retinoic acid regulates murine enteric nervous system precursor proliferation, enhances neuronal precursor differentiation, and reduces neurite growth *in vitro*. *Dev. Biol.* 320, 185–198. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.05.524
- Schemmann, M., Michel, K., Peters, S., Bischoff, S. C., and Neunlist, M. (2002). Cutting-edge technology. III. Imaging and the gastrointestinal tract: Mapping the human enteric nervous system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282, G919–G925. doi: 10.1152/ajpgi.00043.2002
- Schemmann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 55–59. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x
- Schonkeren, S. L., Kütke, T. T., Idris, M., Bon-Frauches, A. C., Boesmans, W., and Melotte, V. (2022). The gut brain in a dish: Murine primary enteric nervous system cell cultures. *Neurogastroenterol. Motil.* 34:e14215. doi: 10.1111/nmo.14215
- Schulte, S., Gries, M., Christmann, A., and Schäfer, K.-H. (2021). Using multielectrode arrays to investigate neurodegenerative effects of the amyloid-beta peptide. *Bioelectron. Med.* 7:15. doi: 10.1186/s42234-021-00078-4
- Smiałowska, M., and Legutko, B. (1992). The development of neuropeptide Y-immunoreactive neurons in a model of pure cortical culture. *Neuroscience* 51, 593–599. doi: 10.1016/0306-4522(92)90299-h
- Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J. P., et al. (2010). Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* 138, 1772–1782. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.053
- Spencer, N. J., Hibberd, T. J., Travis, L., Wiklendt, L., Costa, M., Hu, H., et al. (2018). Identification of a rhythmic firing pattern in the enteric nervous system that generates rhythmic electrical activity in smooth muscle. *J. Neurosci.* 38, 5507–5522. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3489-17.2018
- Taniguchi, M., Kajioka, S., Shozib, H. B., Sawamura, K., and Nakayama, S. (2013). Spatial analysis of slowly oscillating electric activity in the gut of mice using low impedance arrayed microelectrodes. *PLoS One* 8:e75235. doi: 10.1371/journal.pone.0075235
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M. M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., et al. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G976–G987. doi: 10.1152/ajpgi.00427.2010
- Vanden Berghe, P., Bisschops, R., and Tack, J. (2001). Imaging of neuronal activity in the gut. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 563–567. doi: 10.1016/s1471-4892(01)00097-2
- Vanden Berghe, P., and Klingauf, J. (2007). Spatial organization and dynamic properties of neurotransmitter release sites in the enteric nervous system. *Neuroscience* 145, 88–99. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.11.048
- Vanden Berghe, P., Tack, J., and Boesmans, W. (2008). Highlighting synaptic communication in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 135, 20–23. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.001
- Wainger, B. J., Kiskinis, E., Mellin, C., Wiskow, O., Han, S. S. W., Sandoe, J., et al. (2014). Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep.* 7, 1–11. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.019
- Wu, J. J., Chen, J. X., Rothman, T. P., and Gershon, M. D. (1999). Inhibition of *in vitro* enteric neuronal development by endothelin-3: Mediation by endothelin B receptors. *Development* 126, 1161–1173. doi: 10.1242/dev.126.6.1161
- Yang, H., Cong, R., Na, L., Ju, G., and You, S.-W. (2010). Long-term primary culture of highly-pure rat embryonic hippocampal neurons of low-density. *Neurochem. Res.* 35, 1333–1342. doi: 10.1007/s11064-010-0189-0
- Zeldenrust, F., Wadman, W. J., and Englitz, B. (2018). Neural coding with bursts-current state and future perspectives. *Front. Comput. Neurosci.* 12:48. doi: 10.3389/fncom.2018.00048
- Zhou, W., Li, X., Liu, M., Zhao, Y., Zhu, G., and Luo, Q. (2009). Homeostatically regulated synchronized oscillations induced by short-term tetrodotoxin treatment in cultured neuronal network. *Biosystems* 95, 61–66. doi: 10.1016/j.biosystems.2008.06.008

Article 2

The regulation of enteric neuron connectivity by Semaphorin 5A is lost by an autism-linked mutation

Morgane E Le Dréan, Catherine Le Berre-Scoul, Martial Caillaud, Jacques Gonzales, Philippe Hulin, Thibault Oullier, Vincent Paillé, Michel Neunlist, Sophie Talon and Hélène Boudin

(Article en reviewing dans iScience)

The regulation of enteric neuron connectivity by Semaphorin 5A is lost by an autism-linked mutation

Morgane E Le Dréan¹, Catherine Le Berre-Scoul¹, Martial Caillaud¹, Jacques Gonzales¹, Philippe Hulin², Thibault Oullier¹, Vincent Paillé³, Michel Neunlist¹, Sophie Talon¹ and Hélène Boudin^{1*}

¹Université de Nantes Université, INSERM, The enteric nervous system in gut and brain disorder, F-44000 Nantes, France

² Plateforme MicroPICel Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, BioCore, US16, SFR Bonamy, Nantes, France

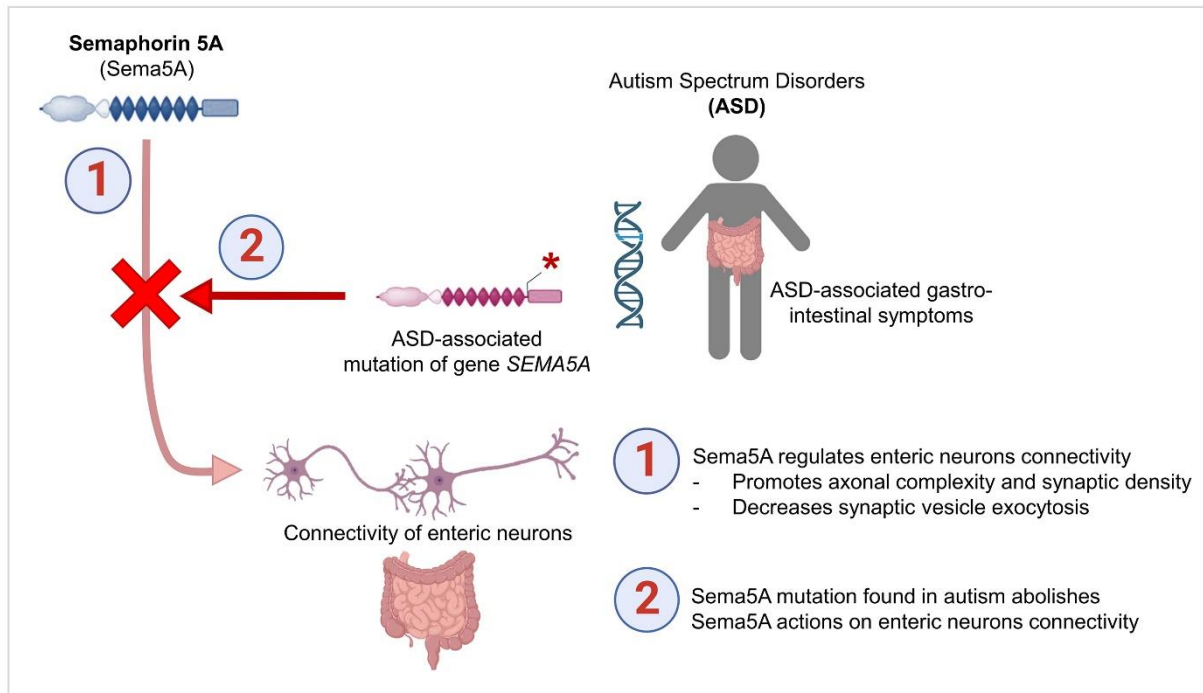
³ Nantes Université, INRAE, IMAD, CRNH-O, UMR 1280, PhAN, Nantes, France

*corresponding authors: Hélène Boudin: helene.boudin@univ-nantes.fr and Morgane E. Le Dréan: morgane.ledrean@univ-nantes.fr

Summary

The neural network of the enteric nervous system (ENS) underlies gastrointestinal functions. However, the molecular mechanisms involved in enteric neuronal connectivity are poorly characterized. Here, we studied the role of semaphorin 5A (Sema5A), previously characterized in the central nervous system, on ENS neuronal connectivity. Sema5A is linked to autism spectrum disorder (ASD), a neurodevelopmental disorder frequently associated with gastrointestinal comorbidities, and potentially associated with ENS impairments. This study investigated the role of Sema5A in axonal patterning and synaptic functions in enteric neurons and explored the impact of ASD-associated mutations on Sema5A activity. Our findings demonstrated that Sema5A promoted axonal complexity and reduced synaptic vesicle exocytosis through regulation of synapsin 1 phosphorylation. Strikingly, the ASD-associated mutation S956G in Sema5A abolished these effects. This study highlights the importance of exploring ASD-associated molecules on ENS functions to better understand gastrointestinal symptoms in autism.

Graphical Abstract



Introduction

The enteric nervous system (ENS) consists of an intricately network of neurons and glial cells independently regulating gastrointestinal functions ¹. ENS neural network requires not only the assembly of neurons into ganglia, but also appropriate growth, orientation and connectivity of axons and dendrites. The precise mechanisms governing enteric neuronal connectivity as well as molecules involved in these processes remain poorly characterized. However, different classes of molecules, including transcription factors ², planar cell polarity pathways ³ and axonal guidance molecules ^{4,5} have been shown to regulate ENS connectivity.

The axonal guidance molecules semaphorins are key molecules for development, maturation and function of the central nervous system (CNS) ⁶. Semaphorins are a family of membrane-bound and secreted proteins that are divided, in vertebrates, into five subfamilies from Sema3 to Sema7 ⁷. Semaphorins signal predominantly through receptor proteins of the plexin and neuropilin families and are implicated in numerous neuronal wiring events in the central and peripheral nervous system ^{6,7}, but little is known on their potential roles in the regulation of ENS neuronal network in health and diseases.

ASD is a neurodevelopmental disorder characterized by impaired social interaction and restricted activity and interest. Among the most prevalent comorbidities in ASD are gastrointestinal (GI) symptoms which are 4.4 times more frequent than in neurotypical individuals ⁸. The causes of GI symptoms are still unknown but might result from abnormalities of enteric neuronal connectivity following a similar principle as impaired CNS neuronal connectivity results in altered behavior. Interestingly, ASD genetic mice models showed gut dysmotility associated with changes in ENS structure regarding enteric neuron number, proportion of neuronal subpopulations and density of interganglionic fibers ⁹⁻¹². Several links have been reported between the semaphorin family member Sema5A and ASD. In human, mutations on the *SEMA5A* gene are associated to severe developmental delay and autism ¹³ but the consequences of these mutations at the cellular levels in the central and enteric nervous system have never been explored. Moreover, mice invalidated for Sema5A exhibit ASD-like behaviors, a phenotype that might be related to the reported functions of Sema5A and its receptors Plexin A1 and Plexin A2 in brain axonal patterning and synaptogenesis ¹⁴⁻¹⁷. Interestingly, Sema5A deficiency in mice induced increased defecation suggesting the implication of Sema5A in gut functions potentially through modulation of ENS activity ¹⁸.

In this context, Sema5A represents an interesting candidate potentially involved in the molecular mechanisms regulating the connectivity of enteric neurons. However, the expression and the role of Sema5A in the ENS have never been studied. In this study, we aim to (1) investigate the role of Sema5A in axonal patterning and synaptic functions of enteric neurons, and (2) assess the impact of ASD-associated mutations on Sema5A activity. Our findings demonstrated that Sema5A promoted axonal complexity and reduced synaptic vesicle exocytosis in enteric neurons. Strikingly, we observed that the ASD-associated S956G mutation in Sema5A resulted in a complete loss of these activities. Alongside identifying Sema5A involvement in ENS connectivity, this study highlights the importance of exploring

the potential contribution of ASD-associated molecule on ENS functions to gain deeper insights into gastrointestinal symptoms in autism.

Materials and Methods

Animals

Pregnant Sprague-Dawley rats were purchased on gestational day 15 (G15) (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France). Rats were individually housed in cages on a 12/12-h light/dark cycle with free access to food and water. Mothers and their pups (10-14 pups/litter) were maintained in the same conditions throughout the protocol. At postnatal day 14 (P14), P35 (adolescence) and P60 (adulthood) of the progeny, rats were anesthetized with isoflurane (5 min; Abbot) and euthanized by cervical dislocation. For primary cell culture, G15 pregnant rats were anesthetized by isoflurane, euthanized by cervical dislocation and the embryos (E15) were collected to proceed to cell culture. All protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement # 02476.01).

Western blot

Tissue. Rat distal colon samples collected at P14 and P60 were lysed in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA and protease inhibitors (Complete; Roche, France) solution, pH 7.4, with a tissue homogenizer (Precellys 24, Bertin Technologies, France) and sonicated three times for 5 sec. For brain samples, used as a positive control for comparison, forebrains of P60 rats were homogenized in RIPA lysis buffer containing protease inhibitor cocktail and centrifuged at 20,000 *g* for 20 min to collect the supernatant. Protein concentration was quantified using the BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, Cillebon sur Yvette, France).

Enteric neuron cultures. Cells were gently scrapped in 50 μ L RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail, 2 mM orthovanadate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma-Aldrich), and were sonicated.

Gut explant. For gut explants cocultured with COS-7 cells, the matrigel dots containing COS cells were first carefully removed from the culture well and the explants were scrapped in RIPA and prepared as described above.

Electrophoresis, transfer and antibody incubation. Samples were further prepared for electrophoresis by adding adjusted volume of NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (NP0007 Thermo Fisher Scientific) and NuPAGE™ Sample Reducing Agent 10X (NP0009 Thermo Fisher Scientific) and were then heated at 95°C for 5 min and loaded onto a NuPAGE 4-12% Bis-Tris Acrylamide gel (NP0322BOX Thermo Fisher Scientific) with MES SDS Running Buffer (NP0002 Thermo Fisher Scientific). Loading were 15 μ g of proteins for colon and brain tissues and 1/10 of culture well for cell cultures and gut explants.

Electrophoretic transfer to nitrocellulose membrane was performed with iBlot Nitrocellulose Transfer stack mini (IB23002 Thermo Fisher Scientific) for 7 minutes at 20 V in an iBlot dry transfer apparatus (IB21001 Thermo Fisher Scientific). Membranes were incubated for 1h in blocking solution composed of Tris-buffered saline (TBS), 0.1% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) non-fat powder milk and were then incubated overnight at 4°C in primary antibodies as follows: rabbit polyclonal anti-Sema5A (1:500, # NBP2-20291 Novus Biologicals; 1:200, #4460-MG R&D Systems), rabbit polyclonal anti-Plexin A1 (1:500, # APR-081 Alomone), goat polyclonal anti-Plexin A2 (1:500, # AF5486 R&D Systems), rabbit monoclonal anti-synapsin 1 (1:1000, # 5297 Cell Signaling), mouse monoclonal anti- β 3-tubulin (1:1000, # T8660 Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-phospho-synapsin 1 (Ser62/67) (1:1000, # 11583501 Thermo Fisher Scientific), rabbit polyclonal anti-phospho-synapsin 1 (Ser603) (1:1000, # PA1-4604 Thermo Fisher Scientific), rabbit polyclonal anti-phospho-synapsin 1 (Ser9) (1:1000, # CST2311 Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000, #9102 Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000; # 9101 Cell Signaling), mouse monoclonal anti-CaMKII alpha (1:1000, # MA1-048 Invitrogen), rabbit monoclonal anti-phospho-CaMKII (Thr286) (D21E4) (1:1000, # 12716 Cell Signaling) and mouse monoclonal anti- β -Actin (1:5000, # A5441 Sigma-Aldrich). Membranes were washed thoroughly with TBS and incubated for 1h with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP) diluted in TBS + 5% non-fat powder milk. Proteins were detected by chemiluminescence with Clarity Western reagents (1705061, Bio-Rad, Marnes la coquette, France) using a ChemiDoc XRS+ system (1708265, Bio-Rad). The ubiquitous protein β -Actin was revealed and used as reference proteins for loading control and normalizing factor for each deposit. For quantification, the relevant immunoreactive bands were selected and quantified with Image Lab software version 5.0 (Bio-Rad). Data are expressed as relative values to β -Actin normalized to the control mean.

Immunofluorescence staining

Tissue. Segments of distal colon from P35 rats were fixed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature (RT) for 3 h. Whole mounts of longitudinal muscle and myenteric plexus were obtained by microdissection and were permeabilized in 10% BSA, 0.5% Triton X-100 and 0.01 % sodium azide diluted in PBS for 2h at RT. Tissues were then incubated with the following primary antibodies: rabbit anti-Sema5A (Novus Biologicals, 1:1000), mouse anti- β 3-tubulin (β 3-tubulin, clone 6G7, DSHB, 1:1000), mouse anti-S100 β (Abnova, 1:500), human anti-Hu⁴ (gift from the CHU of Nantes, France, 1:5000), rabbit anti-plexin A1 (Alomone labs, 1:500) and goat anti-plexin A2 (R&D systems, 1:500) diluted in PBS containing 3% BSA, 0.25 % Triton X-100 and 0.01 % sodium azide overnight at RT. After two washes with PBS, tissues were incubated for 2h at RT with the appropriate Alexa 488-, Cy3-, Cy5- or Alexa 647-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and mounted with ProLong Gold Antifade Reagents (ThermoFisher Scientific).

Cell culture and gut explant. ENS, enteric neuron cultures and gut explants were fixed with 4% PFA for 5 min and permeabilized in PBS containing 0.25% TritonX-100 for 5 min. After washings, the samples were incubated in PBS containing 10% BSA for 30 min to block non-specific sites and were then incubated overnight at RT with primary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA and 0.01% sodium azide: rabbit anti-Sema5A, rabbit anti-plexin A1, goat anti-plexin A2, goat anti-HuC/D (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti- β 3-tubulin (β 3-tubulin, 1:500, Sigma-Aldrich) and rabbit anti-synapsin-1 (1:1000, Cell Signaling). After washings, cells or gut explants were incubated for 2h RT with the appropriate conjugated secondary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA and 0.02% azide.

Sholl analyses. For Sholl analyses, pictures of β 3-tubulin-labeled axons were acquired with an Axio observer Zeiss microscope using Zen software and a x10 objective. A template of concentric circles distant from 60 and 100 μ m from the ganglion center was overlaid on the ganglion using Fiji software. The number of axons crossing each circle was counted for 8 ganglia per culture well. In total, 6 culture wells from 3 experiments were analyzed.

Plasmid constructs

Plasmids encoding rat full-length Sema5A (6xMyc C-terminal-tagged Sema5A), rat extracellular domain of Sema5A (amino acid residues 1-961) fused at the C-terminus with a Fc fragment of human IgG (Sema5A-Fc) and Fc fragment alone as control (Fc) in pcDNA3.0 were provided by A. Kolodkin (Johns Hopkins University, Baltimore, USA). The Sema5A-Fc, corresponding to a soluble protein containing the extracellular domain of Sema5A has previously been shown to be fully functional^{14,19}. The Sema5A mutations described in ASD, S951C and S956G¹³, were generated in Sema5A-Fc with the QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (210519, Agilent Technologies, les Ulis, France) according to manufacturer's instructions and were verified by sequencing.

Cell cultures

COS-7 cell culture and transfection. COS cells were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics. Transfections with plasmids encoding Fc or Sema5A constructs were performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Cillebon sur Yvette, France). After 1 day of transfection, COS cells were gently scrapped and homogenized in Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (Corning, Darmstadt, Germany) at a concentration of 50,000 cells/ μ L to subsequently coculture them with ENS cultures and gut explants. For COS cells and enteric neurons cocultures, transfected COS cells were resuspended in enteric glia-conditioned DMEM culture medium and plated in Transwell inserts (Costar[®] 6,5 mm Transwell[®], 0.4 μ m Pore Polyester membrane inserts) at a concentration of 64,000 cells/100 μ L.

ENS culture. Rat ENS cultures were prepared from E15 rat embryo intestines as previously described²⁰. Briefly, intestines were removed and diced into small pieces in Hank's buffered salt solution (HBSS). The tissue fragments were then mechanically triturated with a scalpel and incubated with 0.25% trypsin (Sigma, # T1426) for 15 minutes and with 0.1% DNase I (Sigma, Cat# DN25) for 10 minutes. The dissociated cells were plated in 24-well plates previously coated with 0.5% gelatin (Sigma, Cat# G6144) at a density of 2.4×10^5 cells/cm² in DMEM/F12 containing antibiotics and 10% FCS. After 24 h, the medium was replaced with DMEM/F12 containing 1% of N-2 supplement (Life Technologies, Cat# 17502-048).

ENS-COS-7 cells coculture: For coculture with Sema5A-Fc-expressing COS cells, 3 μ L of transfected COS cells suspended in matrigel were deposited in the center of the culture well 3h after the plating of gut dissociated cells. To assess the activity of full-length Sema5A on enteric neuron development and allow for cell-cell contact between enteric neurons and COS cells, gut dissociated cells were plated in a culture well containing transfected COS cells (400,000 cells/well). For these two procedures, cells were fixed 4 days after plating. The quantifications from ENS-COS cells coculture were performed around the Matrigel dot at a distance between 0 and 900 μ m from the edge of the Matrigel using Axio observer Zeiss microscope using Zen software (Zeiss, Germany) and a x10 objective. The number of Hu-immunoreactive neurons per ganglion in ENS cultures was scored on 20 ganglia from 4 experiments using Axio observer Zeiss microscope.

Gut explants. The intestine of E15 rat embryos was cut into 6 equal pieces and each piece was placed in a well of a 24-well plate previously coated with collagen (0.05 mg/mL in 20 mM acetic acid) in DMEM high glucose (Gibco, Cillebon sur Yvette, France) containing 50 ng/ml GDNF, 10% FCS, 2 mM glutamine and antibiotics as previously described⁵. The next day, 3 μ L of transfected COS cells suspended in matrigel (50,000 cells/ μ l) were placed 5 mm away from the explant. The coculture is maintained for 3 days before fixation for immunostaining or lysis for Western blot. To determine the number and size of synapsin 1 clusters, axonal arborization surrounding gut explants were exhaustively imaged with a x40 objective and the number and size of synapsin 1 clusters were quantified using Fiji software. To define synapsin 1 clusters, a threshold was set to be two times higher than the underlying fluorescence intensity in the axonal processes. The size and number of synapsin 1 clusters were determined using the Fiji particle analysis tool with a cut off particle size of 0.2 μ m². The number of synapsin 1 clusters was normalized to β 3-tubulin area.

Enteric neuron culture. Primary culture of rat enteric neuron was performed as previously described²¹. Briefly, the intestine of E15 rat embryos were cut into 8 pieces of equal length and placed in a well of a 24-well culture plate previously coated with collagen type I (354236, Corning). After 5 days of culture in enteric glia-conditioned DMEM medium containing GDNF (50 ng/mL) (R&D Systems - biotechne), the explants were delicately removed and the cells having migrated out of the explants were detached with Accutase (07920, StemCell technologies, Saint-Egrève, France). Accutase is then inhibited in DMEM medium, the cells centrifuged (1200rpm, 5 min at RT) and the pellet suspended in enteric glia-conditioned DMEM medium + GDNF (50 ng/mL). Cells were then plated (day 0) either in

Ibidi 24-well plates (ibidi, Gräfelfing, Germany) for FM1-43 imaging or in 24-well plastic culture plates for Western blot analyses. The next day (D1), the antimitotic agent cytosine arabinoside (ARA-C at 5 μ M) was added to prevent proliferation of glial and muscle cells. Two days after plating (D2), Transwell inserts previously plated with transfected COS cells were placed above enteric neurons that were further incubated for 3 days (to D5). To assess synapsin 1 phosphorylation state in stimulated conditions elicited by K⁺-induced depolarization, D5 enteric neurons were stimulated for 60 sec in stimulation buffer (cf. FM1-43) and rested for 15 min in Ca²⁺-free washing buffer before collection in RIPA lysis buffer.

Sema5A acute treatment on enteric neurons cultures:

Enteric neurons culture (at D5) were treated for 5 or 30 min with 30 μ M of recombinant mouse semaphorin 5A Fc Chimera (R&D systems ref: 6584-S5-025) or 30 μ M recombinant Mouse IgG_{2A} FC (R&D systems ref:4460-MG-100) as control. Neurons were lysed in RIPA buffer for Western blot analysis.

FM1-43 imaging

Enteric neurons were incubated for 60 sec at 37°C with 5 μ g/mL of FM 1-43 (Molecular Probes) diluted in stimulation buffer composed of 31.5 mM NaCl, 90 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 25 mM HEPES, 30 mM glucose, pH 7.4. Enteric neurons were then washed for 15 min at 37°C in Ca²⁺-free washing buffer (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, and 30 mM glucose, pH 7.4). Dynamic acquisition was performed using a scanning confocal microscope NIKON A1 RSi (Nikon, Tokyo, Japan) with an oil-immersion objective (\times 63, NA, 1.40). Preparations were imaged during 4 min in stimulation buffer using Galvano mode at 1 fps (excitation :48nm, emission: 530 +/- 20 nm) by NIS-Element software. The fluorescence intensity of FM1-43 clusters was analyzed using the Fiji software. The destaining fraction after 4 min was calculated for each cluster using the formula: 1-(Fluo at 4min/Fluo at 0s).

Statistical analysis

GraphPad Prism 8 was used for conducting the statistical analysis and data interpretation. Data are presented as mean \pm SEM. Group comparisons were executed by first, assessing normal distribution and deploying, accordingly, the t-test or one-way ANOVA or parametric tests or the Mann-Whitney test or Kruskal–Wallis test supplemented by Dunn’s post-hoc test for non-parametric tests. Statistical significance thresholds were set as “ns” (non-significant) for p-value > 0.05, * for p-value <0.05, ** for p-value <0.01 and

Results

Sema5A and the Plexin A1 and A2 receptors are expressed in enteric neurons of rat distal colon

First, we assessed by western blots the protein expression of Sema5A and its receptors Plexin A1 and Plexin A2 in the rat distal colon and brain lysates, the latter being used as a positive control. Regarding Sema5A, we found a band at ~140 kDa in both colon and brain samples with additional bands of lower molecular weights likely resulting from protein degradation or ectodomain shedding as previously described^{19,22,23} (Fig. 1A). Regarding the receptors, Plexin A1 and A2 antibodies yielded a band at 220 and 200 kDa respectively in rat brain and colon preparations (Fig. 1B). Next, the cellular distribution of Sema5A and Plexin A1/A2 receptors was studied in rat gut. Whole mount myenteric plexus of distal colon were immunolabeled for Sema5A, Plexin A1 or Plexin A2 in combination with markers of neuronal cell bodies (Hu), axonal fibers (β 3-tubulin) and glial cells (S100 β). Sema5A immunolabeling was observed in a subset of neuronal cell bodies and processes as shown by respective overlap with Hu and β 3-tubulin immunolabeling (Fig. 2A,A',B,B'). By contrast, Sema5A was not detected in enteric glial cells as shown by a lack of overlap of Sema5A and S100 β immunolabeling (Fig. 2C,C',D,D'). Plexin A1 receptors were observed in neuronal cell bodies and axonal fibers (Fig. 2E,E'). Of note, Plexin A1 was notably found at the periphery of the neuronal cell bodies, suggesting a cell surface localization (Fig. 2F,F'). Plexin A2 showed an intense immunofluorescence intensity in a subset of neuronal cell bodies corresponding to large neurons and was also observed at the border of small-size enteric neurons and in a few axonal processes (Fig. 2G,G'). Immunolabelings for Plexin A1 and A2 were not found in glial cells (not shown). These results support a selective neuronal expression of Sema5A and the receptors Plexin A1/A2 in the rat distal colon.

With the aim of studying the effects of Sema5A on enteric neuronal connectivity using *in vitro* ENS culture models, we first validated the expression of Sema5A, PlexinA1/A2 in an ENS culture model derived from embryonic rat gut previously used for cellular studies on enteric neuron connectivity^{4,5}. We found that Sema5A and Plexin A1/A2 were present in neurons, associated with both neuronal cell bodies and axonal processes, but not in glial cells, as observed in rat colon (Fig. 3A, B, C). These results indicated that the cellular expression and distribution of Sema5A and PlexinA1/A2 in ENS *in vitro* model derived from embryonic rat gut were similar to gut tissue.

Sema5A enhances axonal complexity of enteric neurons that is abolished by ASD-associated mutation.

To study the effects of Sema5A and its ASD-associated mutant forms on the expression of Plexin A1/A2 receptors and β 3-tubulin, as a key axonal structural element, transfected COS cells were used to produce soluble Sema5A-Fc fusion protein, Sema5A-Fc with the mutation S951G and S956G, and a control molecule corresponding to the Fc fragment alone. We first verified by Western blot that wild-type and mutant Sema5A proteins were successfully expressed and secreted by transfected COS cells in an equivalent amount (Supplemental data, Fig. S1). Then, transfected COS cells were suspended in

matrigel and were cocultured with embryonic rat gut explants (Fig. 4A), a model previously shown to rapidly develop a profuse axonal arbor within 3 days after plating⁵, which is appropriate with the transient expression of Sema5A fusion proteins by COS cells. Western blots performed from gut explants after 3 days of coculture indicated that Sema5A-Fc induced a reduction of Plexin A1 receptor expression level compared to the Fc control condition (Fig. 4B; $p < 0.001$ Kruskal–Wallis test with Dunn’s post-test). This effect was retained with the Sema5A mutations S951C and S956G (Fig. 4B). The expression of Plexin A2 receptor remained unaffected by Sema5A-Fc or its mutants (Fig. 4B). Regarding the expression of β 3-tubulin, no change was observed between groups (Fig. 4C). To go further in the investigation of axonal structure, we examined the impact of Sema5A on the enteric neuronal network architecture by a method based on Sholl analysis as previously described in a model of ENS culture²⁴. Transfected COS cells suspended in matrigel were added to ENS cultures and were cocultured for 4 days to analyze the axonal complexity surrounding enteric ganglia by Sholl analysis (Fig. 6D,E). Measurements performed in the axonal arbor at a distance of 60 μ m from the center of the ganglion showed no difference between the constructs (Fig. 4E,F). By contrast, measurements performed in a more distal portion of the axonal arbor (160 μ m from the center of the ganglion) showed an increased axonal complexity in the presence of COS cells expressing Sema5A-Fc compared to Fc control condition ($n=6$ from 3 independent experiments; $p < 0.016$, two-way ANOVA with Turkey post-test; Fig. 4E,F). No difference was observed between the control Fc and the Sema5A mutants, S951C or S956G, at both 60 and 160 μ m from the center of the ganglion (Fig. 4F). The same results were obtained with the membrane-associated full-length Sema5A (Supplemental data Fig. S2). Because the extent of axonal arborization also depends on the number of neuronal cell bodies per ganglion, we counted the number of neurons per ganglion and found no difference between groups ($n=7$ culture wells from 3 independent experiments; $p=0.256$ Kruskal-Wallis; Fig. 4G).

Sema5A regulates synapsin 1 clustering and phosphorylation which is abolished by the ASD-linked S956G mutation.

Given that axonal branching and complexity are intricately linked to synapse formation/stabilization²⁵, we investigated the impact of Sema5A and its mutant forms on synapses as assessed by protein expression and cluster distribution of synapsin 1, a central presynaptic protein. Embryonic rat gut explants were cocultured for 3 days with transfected COS cells for Fc, Sema5A-Fc or Sema5A-Fc mutant forms placed in matrigel (Fig. 4A). Western blot performed on gut explants showed no change in synapsin 1 protein level between groups (Fig. 5A). The number of synapsin 1 clusters was measured on gut explants immunolabeled for β 3-tubulin and synapsin 1. Gut explants cultured with Sema5A-Fc-transfected COS cells showed an enhanced density of synaptic clusters compared to explants cultured with Fc-transfected cells (Fig. 5B,D; $p=0.039$, ANOVA with Dunn’s post-test). While the mutation S951C had no impact on the promoting effect of Sema5A-Fc on synapse density, the mutation S956G inhibited the ability of Sema5A-Fc to enhance synapse density (Fig. 5B,D; $p=0.005$, ANOVA with Dunn’s post-test). Sema5A-Fc showed no effect on the size of synapsin 1 clusters (Fig. 5C). The subcellular

localization and function of synapsin 1 is highly regulated by its phosphorylation state. As a first attempt, we examined whether Sema5A might affect synapsin 1 phosphorylation at Ser603, one of the pivotal sites regulating synapsin 1 function and its dissociation from synaptic vesicles²⁶⁻²⁸. We found that Sema5A-Fc induced an increased level of phosphorylated synapsin 1 at Ser603 compared to the control Fc condition (Supplemental data Fig. S3). These results suggest that Sema5A could act on enteric neurons by regulating synapsin 1 clustering and phosphorylation. To further investigate the direct response of enteric neurons to Sema5A stimulation on synapsin 1 phosphorylation, we used a culture model highly purified in enteric neurons²¹. COS cells transfected with Fc, Sema5A-Fc or Sema5A-Fc-S956G constructs were plated on Transwell inserts deposited above enteric neurons to allow the Fc and Sema5A proteins to diffuse from COS cells to enteric neurons. Using site-specific phospho synapsin 1 antibodies, we analyzed by Western blot the levels of synapsin 1 phosphorylation at Ser603 and Ser9, involved in synapsin 1 dissociation from synaptic vesicles^{26,27}, and at Ser62/67, involved in synapsin 1 dissociation from actin filaments²⁹. We found that Sema5A-Fc, but not the mutant form S956G, induced in enteric neurons an increased level of phosphorylated synapsin 1 at site Ser603 compared to the control Fc condition (Fig. 6). The other phosphorylation sites Ser9 and Ser62/67 were unaffected by Sema5A-Fc treatment (Fig. 6).

Sema5A decreases synaptic vesicle exocytosis and the ASD-linked S956G mutation abrogated these effects.

Phosphorylation of synapsin 1 at Ser603 acts as a molecular trigger, leading to the dissociation of synapsin 1 from synaptic vesicles. This mechanism plays a crucial role in synaptic vesicle release at the active zone²⁶⁻²⁸. Thus, we investigated the impact of Sema5A on synaptic vesicle exocytosis by imaging the presynaptic release of the dye FM1-43 as previously described in central and enteric neurons^{21,30,31}. After FM1-43 loading in neurons within synaptic vesicles, enteric neurons were stimulated by KCl-induced depolarization for 4 min and the fluorescence decrease was recorded. The decrease of FM1-43 fluorescence intensity corresponds to the fusion of synaptic vesicles with the plasma membrane and the release of the dye, therefore providing an indicator of the synaptic vesicle exocytosis activity (Fig. 7A). Measurements of the fluorescence intensity of FM1-43 clusters over the 4 min of recording showed that the loss of fluorescence was reduced when enteric neurons were cocultured with COS cells transfected with Sema5A-Fc compared to control Fc or the mutant Sema5A-Fc-S956G (Fig. 7B). Quantification performed at 4 min after the addition of KCl indicated that the destaining fraction was significantly lower in the presence of Sema5A-Fc than control Fc or the mutant Sema5A-S956G-Fc suggesting that Sema5A reduced synaptic vesicle release induced by KCl depolarization and lost this activity with the S956G mutation (Fig. 7C). In parallel, we examined the effects of Sema5A-Fc on synapsin 1 phosphorylation upon neuronal depolarization induced by KCl. Sema5A-Fc induced a reduced phosphorylation level at Ser603 and Ser9 compared to neurons cocultured with COS cells expressing the control Fc (Fig. 7D). Moreover, the reduced level of synapsin 1 phosphorylation at Ser603 was not observed in neurons cocultured with COS cells expressing Sema5A-S956G-Fc (Fig. 7D).

No change for the phosphorylation site Ser62/67 was observed between groups (Fig. 7D). Previous studies indicate that Ser603 and Ser9 are phosphorylated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and CaMKII/ protein kinase A respectively while Ser62/67 is phosphorylated by extracellular signal-regulated kinase (ERK) ^{26,29}. Therefore, we asked whether Sema5a could induce CaMKII or ERK activation by examining their level of phosphorylation at Tyr286 and Thr202/Tyr204, respectively. Enteric neurons exposed to Sema5A for 5 min showed an increased CaMKII phosphorylation while ERK phosphorylation was unaffected (Fig. 8A,B). In addition, the Sema5A-induced increase of CaMKII phosphorylation was associated with an increased level of synapsin 1 phosphorylation at Ser603 (Fig. 8C). Altogether, these results suggest that Sema5A modulate synapsin 1 phosphorylation potentially through the activation of CaMKII.

Discussion

In this study, we provide evidence that Sema5A, encoded by the *SEMA5A* susceptibility gene for autism, is expressed by enteric neurons and regulates their functional connectivity. Our data showed that Sema5A increased axonal complexity and synapse density of enteric neurons. At the synaptic level, we found that Sema5A exerts a bidirectional control of synapsin 1 phosphorylation depending on neuronal depolarization and reduces synaptic vesicle exocytosis. Remarkably, these Sema5A-induced effects were abolished by the ASD-linked S956G mutation. Altogether, our data suggest that an ASD-linked mutation disables Sema5A activity on enteric neuron function that could contribute to gastrointestinal disorders associated with ASD pathophysiology.

First, we showed that sema5A and its related receptors PlexinA1 and Plexin A2 were selectively expressed by enteric neurons in rat colon. Western blot analysis for Sema5A showed a band at 140 kDa in brain and gut-derived samples, consistent with the reported molecular weight in various tissues and cell lines ^{19,22,32 33}. We also observed Sema5A-immunoreactive bands at molecular weight lower than 140 kDa, notably in the range of 90-110 kDa, corresponding to the molecular weight of a soluble form of Sema5A resulting from proteolytic cleavage of the extracellular domain shown to be released by various cell lines ^{23,34}. Therefore, the 90-110 kDa forms detected in brain and colon might represent a secreted form of Sema5A. At the cellular level in rat colon and ENS cultures, Sema5A, Plexin A1 and A2 receptors were selectively expressed by enteric neurons but not by enteric glial cells. The identity of the receptors mediating Sema5A activity in enteric neurons has not been addressed in this study. Both Plexin A1 and Plexin A2 represent attractive candidate receptors giving their cellular distribution in enteric neurons and their reported involvement in Sema5A signaling in other contexts including central neurons and cancer cell lines ^{6,14}. Moreover, we found that treatment of gut explants with Sema5A for 3 days induced a reduction of Plexin A1 protein expression level without affecting Plexin A2. Changes in protein level of neuroreceptors are common consequences of their agonist-induced activation ³⁵. Therefore, the downregulation of Plexin A1 upon Sema5A stimulation might be regarded as a clue for a preferential involvement of Plexin A1 in mediating Sema5A activity in enteric neurons.

The patterning of axonal arbor and synaptic connections underlie neuronal connectivity that drives coordinated functions of the ENS. In this study we identified Sema5A as a molecular signal controlling these processes by promoting axonal complexity and limiting presynaptic activity. The methodology used to assess the extent of axonal arbor was based on Sholl analysis that integrates both the length and the number of axonal fibers. The fact that a facilitating effect was observed at distance, but not close, from the ganglion suggests that Sema5A would mostly regulate the terminal arborization but not the number of primary axons emerging from neuronal cell bodies. This interpretation is supported by protein expression level of the axonal protein β 3-tubulin, unaffected by Sema5A stimulation. These results suggest that the main axonal fibers were preserved but that Sema5A would regulate fine distal axonal branching, containing low level of β 3-tubulin, therefore marginally contributing to the total amount of β 3-tubulin. The Sema5A-induced promoting effect on axonal arbor extension of enteric neurons is consistent with previous studies reporting a permissive activity of Sema5A on axon elongation of dorsal root ganglia and in the diencephalon^{17,22}. In addition, we found that Sema5A enhanced the number of synapses, defined as synapsin 1 clusters, and the level of synapsin 1 phosphorylation at Ser603. Phosphorylation at Ser603 represents a molecular signal for synapsin 1 dissociation from synaptic vesicles, resulting in dispersion of synapsin 1 from presynaptic terminals to axonal regions²⁶. It is thus expected that an increased synaptic clustering of synapsin 1 would be associated with a decreased level of Ser603 phosphorylation, which is not the case in our study. It is therefore unlikely that the mechanism underlying the Sema5A-induced clustering of synapsin 1 relies on the ability of Sema5A to increase synapsin 1 phosphorylation level at Ser603. The presynaptic targeting of synapsin 1 has been shown to be regulated by *O*-glycosylation at several Ser residues³⁶ and by multiple molecular interactions between different domains constituting synapsin 1 and between synapsin 1 isoforms³⁷. Whether Sema5A-induced synapsin 1 clustering in enteric neurons is achieved through regulation of *O*-glycosylation or homo- and heterodimerization of synapsin 1 remains to be studied.

Interestingly, we found that Sema5A exerts a bidirectional control of synapsin 1 phosphorylation depending on neuronal depolarization. Under resting condition, Sema5A increased phosphorylation at Ser603 while no modification of phosphorylation was observed at Ser9 and Ser62/67. The phosphorylation at Ser603 and Ser9, achieved by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and CaMKII/protein kinase A respectively, promotes the dissociation of synapsin 1 from synaptic vesicles, resulting in the transition of the synaptic vesicles from a reserve pool to a readily-releasable pool as a mechanism enabling sustained synaptic transmission³⁸. Phosphorylation at Ser62/67, achieved by ERK, reduces the interaction between synapsin 1 and actin cytoskeleton contributing also to the docking of synaptic vesicles in the readily-releasable pool²⁹. By showing a selective increase of Ser603 phosphorylation induced by Sema5A, compared to Ser9 and Ser62/67, our data suggest that Sema5A would preferentially decrease tethering of synapsin 1 to synaptic vesicles through CaMKII activation. In agreement with this hypothesis, we found that Sema5A increased the phosphorylation of CaMKII at Tyr-286, but not that of ERK. Another possibility is that Sema5A could inhibit the activity of the protein phosphatase A2 shown to be involved in the dephosphorylation of

synapsin 1 at Ser603³⁹. Using FM1-43-based imaging, we found that Sema5A reduced synaptic vesicle release induced by KCl depolarization. This inhibitory activity of Sema5A on synaptic strength is consistent with previous studies showing that Sema5A inhibited synaptic transmission in hippocampal dendate granule cells¹⁴. It is well-established that depolarization-driven phospho-signaling targets several phosphorylation sites on synapsin 1 that promotes the availability of synaptic vesicles at the active zone for exocytosis. We found that pretreatment of enteric with Sema5A reduced phosphorylation at Ser603 and Ser9 compared to neurons pre-treated with Fc upon neuronal depolarization. Our data suggest that upon depolarization, Sema5A negatively regulated synaptic vesicle exocytosis through the inhibition of synapsin 1 phosphorylation at Ser603 and Ser9. Altogether, our results identify Sema5A as a bifunctional regulator of synapsin 1 phosphorylation in an activity-dependent manner. Under resting condition, by facilitating synapsin 1 phosphorylation at Ser603, Sema5A would promote the translocation of synaptic vesicle to the readily-releasing pool, while upon neuronal depolarization, Sema5A reduces synapsin 1 phosphorylation at Ser603 and Ser9, thus restraining synaptic vesicle exocytosis. The ability of Sema5A to exert bifunctional activity depending on the environmental context is in accordance with previous studies showing in the central nervous system that Sema5A can exhibit facilitating or inhibitory activity on axonal guidance according to the molecular composition of the extracellular matrix²². Whether this dual activity of Sema5A relies also on its molecular form as a membrane-bound or secreted proteolytic-cleaved protein, as shown for Sema5B on synapse elimination⁴⁰ remains to be determined.

We also investigated the impact of a Sema5A ASD-linked mutation (S956G) on Sema5A enteric neuron connectivity and presynaptic activity. We observed that this mutation abolished Sema5A-induced effects on axonal arborization, synapsin 1 cluster density and presynaptic functions. The mutation S956G is a missense variant affecting a conserved amino-acid located just before the first thrombospondin domain¹³. The thrombospondin repeats of Sema5A have been shown to play a critical role in the interaction with the extracellular matrix, influencing Sema5A activity on central neurons connectivity²². Therefore, S956G mutation could limit Sema5A ability to interact with component of the extracellular matrix or other binding partners yet to be characterized. The S951C mutation located in the same Sema5A molecular domain than the S956G mutation preserved Sema5A activity. This result is unclear, but suggests that this mutation likely maintained the molecular conformation of Sema5A required to exert its activity on the studied parameters. The loss of function of Sema5A induced by the S956G mutation on its inhibitory activity on synaptic vesicle exocytosis suggests that impaired synaptic vesicle dynamics of enteric neurons could be associated with autism. In agreement with this, mutations found in synapsin 1 and associated with ASD induce defects in synaptic vesicle availability or exocytosis^{41,42}. By showing that Sema5A-associated ASD mutation disrupted Sema5A activity on synapsin 1 phosphorylation and synaptic vesicle dynamic, our study supports the importance of impaired presynaptic mechanisms in ASD.

In conclusion, this study sheds light on the role of Sema5A in enteric neuron connectivity and synaptic functions and demonstrated the impact of ASD-associated mutation on Sema5A activity that might potentially contribute to ENS dysfunctions and gastrointestinal symptoms in ASD.

Limitations of the study

One limitation of this study is the lack of *in vivo* evidence that *Sema5A* regulate enteric neuron connectivity. Examination of enteric neuron network in the gut of *Sema5A*^{-/-} mice in future studies would enhance the physiological robustness of our findings. Furthermore, although we identified a previously undescribed significance of the ASD-associated *Sema5A* mutation S956G on *Sema5A* activity, validating these findings in *in vivo* models would require the future availability of transgenic mouse lines that specifically express this *Sema5A* mutant form in enteric neurons.

Acknowledgement

The expression vectors encoding Fc and *Sema5A*-Fc were a gift from AL. Kolodkin (Johns Hopkins University). We thank P. Bréhéret for initial experiments. The 6G7 anti β 3-tubulin antibody developed by University of Pittsburgh was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. This work was supported by Inserm, Région Pays de la Loire (Enterautisme), ANR Microbiautism (ANR-10-INBS-04) and ExtraNeuro (ANR-22-CE14-0043). We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04).

Author contributions

MELD, ST and HB designed the study; MELD, CLBS, MC and JG performed the experiments; PH helped for confocal microscopy and image analyses; MELD, CLBS, ST and HB analyzed data and interpreted results; MELD and HB wrote the manuscript and prepared figures; MELD and HB supervised the project; MC and MN revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Inclusion and diversity

We support inclusive, diverse, and equitable conduct of research.

References

1. Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 9, 286-294. 10.1038/nrgastro.2012.32.
2. Chalazonitis, A., Tang, A.A., Shang, Y., Pham, T.D., Hsieh, I., Setlik, W., Gershon, M.D., and Huang, E.J. (2011). Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates postnatal development of enteric dopaminergic neurons and glia via BMP signaling.

- The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31, 13746-13757. 10.1523/JNEUROSCI.1078-11.2011.
3. Sasselli, V., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., Tissir, F., Goffinet, A.M., and Pachnis, V. (2013). Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *The Journal of clinical investigation* 123, 1763-1772. 10.1172/JCI66759.
 4. Bodin, R., Paille, V., Oullier, T., Durand, T., Aubert, P., Le Berre-Scoul, C., Hulin, P., Neunlist, M., and Cisse, M. (2021). The ephrin receptor EphB2 regulates the connectivity and activity of enteric neurons. *J Biol Chem* 297, 101300. 10.1016/j.jbc.2021.101300.
 5. Gonzales, J., Le Berre-Scoul, C., Dariel, A., Breheret, P., Neunlist, M., and Boudin, H. (2020). Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity and is inversely associated with synapsin 1 expression in Hirschsprung disease. *Sci Rep* 10, 15119. 10.1038/s41598-020-71865-3.
 6. Pasterkamp, R.J. (2012). Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat Rev Neurosci* 13, 605-618. 10.1038/nrn3302.
 7. Mizuno, Y., Nakanishi, Y., and Kumanogoh, A. (2023). Pathophysiological functions of semaphorins in the sympathetic nervous system. *Inflamm Regen* 43, 30. 10.1186/s41232-023-00281-7.
 8. McElhanon, B.O., McCracken, C., Karpen, S., and Sharp, W.G. (2014). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics* 133, 872-883. 10.1542/peds.2013-3995.
 9. Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stessman, H.A., Coe, B.P., Penn, O., Witherspoon, K., Gerds, J., Baker, C., Vulto-van Silfhout, A.T., et al. (2014). Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* 158, 263-276. 10.1016/j.cell.2014.06.017.
 10. Golubeva, A.V., Joyce, S.A., Moloney, G., Burokas, A., Sherwin, E., Arbolea, S., Flynn, I., Khochanskiy, D., Moya-Perez, A., Peterson, V., et al. (2017). Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism. *EBioMedicine* 24, 166-178. 10.1016/j.ebiom.2017.09.020.
 11. Hosie, S., Ellis, M., Swaminathan, M., Ramalhosa, F., Seger, G.O., Balasuriya, G.K., Gillberg, C., Rastam, M., Churilov, L., McKeown, S.J., et al. (2019). Gastrointestinal dysfunction in patients and mice expressing the autism-associated R451C mutation in neuroligin-3. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 12, 1043-1056. 10.1002/aur.2127.
 12. Margolis, K.G., Li, Z., Stevanovic, K., Saurman, V., Israelyan, N., Anderson, G.M., Snyder, I., Veenstra-VanderWeele, J., Blakely, R.D., and Gershon, M.D. (2016). Serotonin transporter variant drives preventable gastrointestinal abnormalities in development and function. *The Journal of clinical investigation* 126, 2221-2235. 10.1172/JCI84877.
 13. Mosca-Boidron, A.L., Gueneau, L., Huguet, G., Goldenberg, A., Henry, C., Gigot, N., Pallesi-Pocachard, E., Falace, A., Duplomb, L., Thevenon, J., et al. (2016). A de novo microdeletion of SEMA5A in a boy with autism spectrum disorder and intellectual disability. *European journal of human genetics : EJHG* 24, 838-843. 10.1038/ejhg.2015.211.
 14. Duan, Y., Wang, S.H., Song, J., Mironova, Y., Ming, G.L., Kolodkin, A.L., and Giger, R.J. (2014). Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells. *Elife* 3. 10.7554/eLife.04390.
 15. Matsuoka, R.L., Chivatakarn, O., Badea, T.C., Samuels, I.S., Cahill, H., Katayama, K., Kumar, S.R., Suto, F., Chedotal, A., Peachey, N.S., et al. (2011). Class 5 transmembrane semaphorins control selective Mammalian retinal lamination and function. *Neuron* 71, 460-473. 10.1016/j.neuron.2011.06.009.
 16. Zhao, X.F., Kohen, R., Parent, R., Duan, Y., Fisher, G.L., Korn, M.J., Ji, L., Wan, G., Jin, J., Puschel, A.W., et al. (2018). PlexinA2 Forward Signaling through Rap1

- GTPases Regulates Dentate Gyrus Development and Schizophrenia-like Behaviors. *Cell Rep* 22, 456-470. 10.1016/j.celrep.2017.12.044.
17. Masuda, T., Sakuma, C., Yaginuma, H., and Taniguchi, M. (2014). Attractive and permissive activities of semaphorin 5A toward dorsal root ganglion axons in higher vertebrate embryos. *Cell Adh Migr* 8, 603-606. 10.4161/19336918.2014.972770.
 18. Gunn, R.K., Huentelman, M.J., and Brown, R.E. (2011). Are Sema5a mutant mice a good model of autism? A behavioral analysis of sensory systems, emotionality and cognition. *Behav Brain Res* 225, 142-150. 10.1016/j.bbr.2011.07.008.
 19. Goldberg, J.L., Vargas, M.E., Wang, J.T., Mandemakers, W., Oster, S.F., Sretavan, D.W., and Barres, B.A. (2004). An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *J Neurosci* 24, 4989-4999. 10.1523/JNEUROSCI.4390-03.2004.
 20. Chevalier, J., Derkinderen, P., Gomes, P., Thinard, R., Naveilhan, P., Vanden Berghe, P., and Neunlist, M. (2008). Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol* 586, 1963-1975. 10.1113/jphysiol.2007.149815.
 21. Caillaud, M., Le Drean, M.E., De-Guilhem-de-Lataillade, A., Le Berre-Scoul, C., Montnach, J., Nedellec, S., Loussouarn, G., Paille, V., Neunlist, M., and Boudin, H. (2022). A functional network of highly pure enteric neurons in a dish. *Front Neurosci* 16, 1062253. 10.3389/fnins.2022.1062253.
 22. Kantor, D.B., Chivatakarn, O., Peer, K.L., Oster, S.F., Inatani, M., Hansen, M.J., Flanagan, J.G., Yamaguchi, Y., Sretavan, D.W., Giger, R.J., and Kolodkin, A.L. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 44, 961-975. 10.1016/j.neuron.2004.12.002.
 23. Sadanandam, A., Sidhu, S.S., Wullschleger, S., Singh, S., Varney, M.L., Yang, C.S., Ashour, A.E., Batra, S.K., and Singh, R.K. (2012). Secreted semaphorin 5A suppressed pancreatic tumour burden but increased metastasis and endothelial cell proliferation. *Br J Cancer* 107, 501-507. 10.1038/bjc.2012.298.
 24. Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M., and Boudin, H. (2017). A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol* 595, 583-598. 10.1113/JP271989.
 25. Ruthazer, E.S., Li, J., and Cline, H.T. (2006). Stabilization of axon branch dynamics by synaptic maturation. *J Neurosci* 26, 3594-3603. 10.1523/JNEUROSCI.0069-06.2006.
 26. Chi, P., Greengard, P., and Ryan, T.A. (2001). Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nat Neurosci* 4, 1187-1193. 10.1038/nn756.
 27. Chi, P., Greengard, P., and Ryan, T.A. (2003). Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron* 38, 69-78. 10.1016/s0896-6273(03)00151-x.
 28. Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., and Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780-785. 10.1126/science.8430330.
 29. Jovanovic, J.N., Benfenati, F., Siow, Y.L., Sihra, T.S., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Greengard, P., and Czernik, A.J. (1996). Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3679-3683. 10.1073/pnas.93.8.3679.
 30. Betz, W.J., Mao, F., and Smith, C.B. (1996). Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6, 365-371. 10.1016/s0959-4388(96)80121-8.
 31. Boesmans, W., Gomes, P., Janssens, J., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2008). Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut* 57, 314-322. 10.1136/gut.2007.131839.
 32. Ho, W.Y., Chang, J.C., Tyan, S.H., Yen, Y.C., Lim, K., Tan, B.S.Y., Ong, J., Tucker-Kellogg, G., Wong, P., Koo, E., and Ling, S.C. (2019). FUS-mediated dysregulation of Sema5a, an autism-related gene, in FUS mice with hippocampus-dependent cognitive deficits. *Hum Mol Genet* 28, 3777-3791. 10.1093/hmg/ddz217.

33. Good, P.F., Alapat, D., Hsu, A., Chu, C., Perl, D., Wen, X., Burstein, D.E., and Kohtz, D.S. (2004). A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* *91*, 716-736. 10.1111/j.1471-4159.2004.02766.x.
34. Ko, P.H., Lenka, G., Chen, Y.A., Chuang, E.Y., Tsai, M.H., Sher, Y.P., and Lai, L.C. (2020). Semaphorin 5A suppresses the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells. *Int J Oncol* *56*, 165-177. 10.3892/ijo.2019.4932.
35. Hadcock, J.R., and Malbon, C.C. (1991). Regulation of receptor expression by agonists: transcriptional and post-transcriptional controls. *Trends Neurosci* *14*, 242-247. 10.1016/0166-2236(91)90124-d.
36. Skorobogatko, Y., Landicho, A., Chalkley, R.J., Kossenkov, A.V., Gallo, G., and Vosseller, K. (2014). O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) site thr-87 regulates synapsin I localization to synapses and size of the reserve pool of synaptic vesicles. *J Biol Chem* *289*, 3602-3612. 10.1074/jbc.M113.512814.
37. Gitler, D., Xu, Y., Kao, H.T., Lin, D., Lim, S., Feng, J., Greengard, P., and Augustine, G.J. (2004). Molecular determinants of synapsin targeting to presynaptic terminals. *J Neurosci* *24*, 3711-3720. 10.1523/JNEUROSCI.5225-03.2004.
38. Zhang, M., and Augustine, G.J. (2021). Synapsins and the Synaptic Vesicle Reserve Pool: Floats or Anchors? *Cells* *10*. 10.3390/cells10030658.
39. Jovanovic, J.N., Sihra, T.S., Nairn, A.C., Hemmings, H.C., Jr., Greengard, P., and Czernik, A.J. (2001). Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca²⁺-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci* *21*, 7944-7953. 10.1523/JNEUROSCI.21-20-07944.2001.
40. O'Connor, T.P., Cockburn, K., Wang, W., Tapia, L., Currie, E., and Bamji, S.X. (2009). Semaphorin 5B mediates synapse elimination in hippocampal neurons. *Neural Dev* *4*, 18. 10.1186/1749-8104-4-18.
41. Bonnycastle, K., Davenport, E.C., and Cousin, M.A. (2021). Presynaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders: Insights from the synaptic vesicle life cycle. *J Neurochem* *157*, 179-207. 10.1111/jnc.15035.
42. Tang, L.T., Craig, T.J., and Henley, J.M. (2015). SUMOylation of synapsin Ia maintains synaptic vesicle availability and is reduced in an autism mutation. *Nat Commun* *6*, 7728. 10.1038/ncomms8728.

Figures and legends

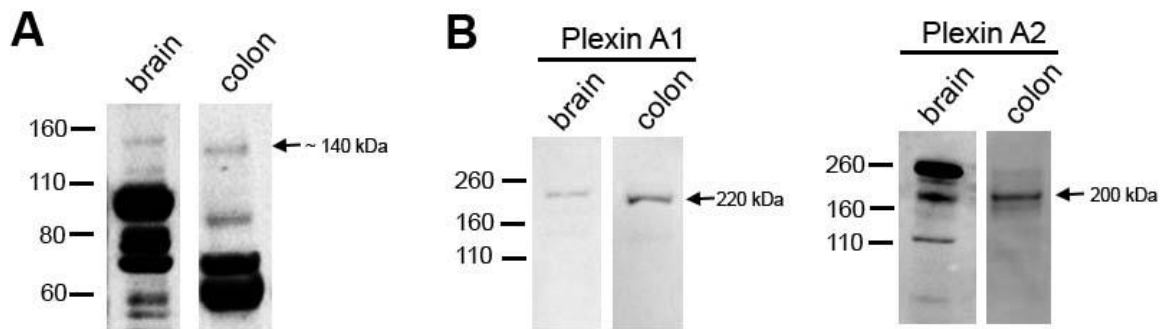


Fig. 1: Expression of Sema5A and its receptors Plexin A1 and Plexin A2 in rat brain and colon. (A) Western blot of Sema5A from rat brain and distal colon. For each sample, 10 μ g of proteins were loaded on a 4-12% LDS-NuPage and immunoblotted with Sema5A antibody. A band at \sim 140 kDa was detected as well as additional bands with lower molecular weights. (B) Western blot of Plexin A1 and Plexin A2 from rat brain and distal colon. In both samples, a band at 220 and 200 kDa was detected for Plexin A1 and Plexin A2 respectively.

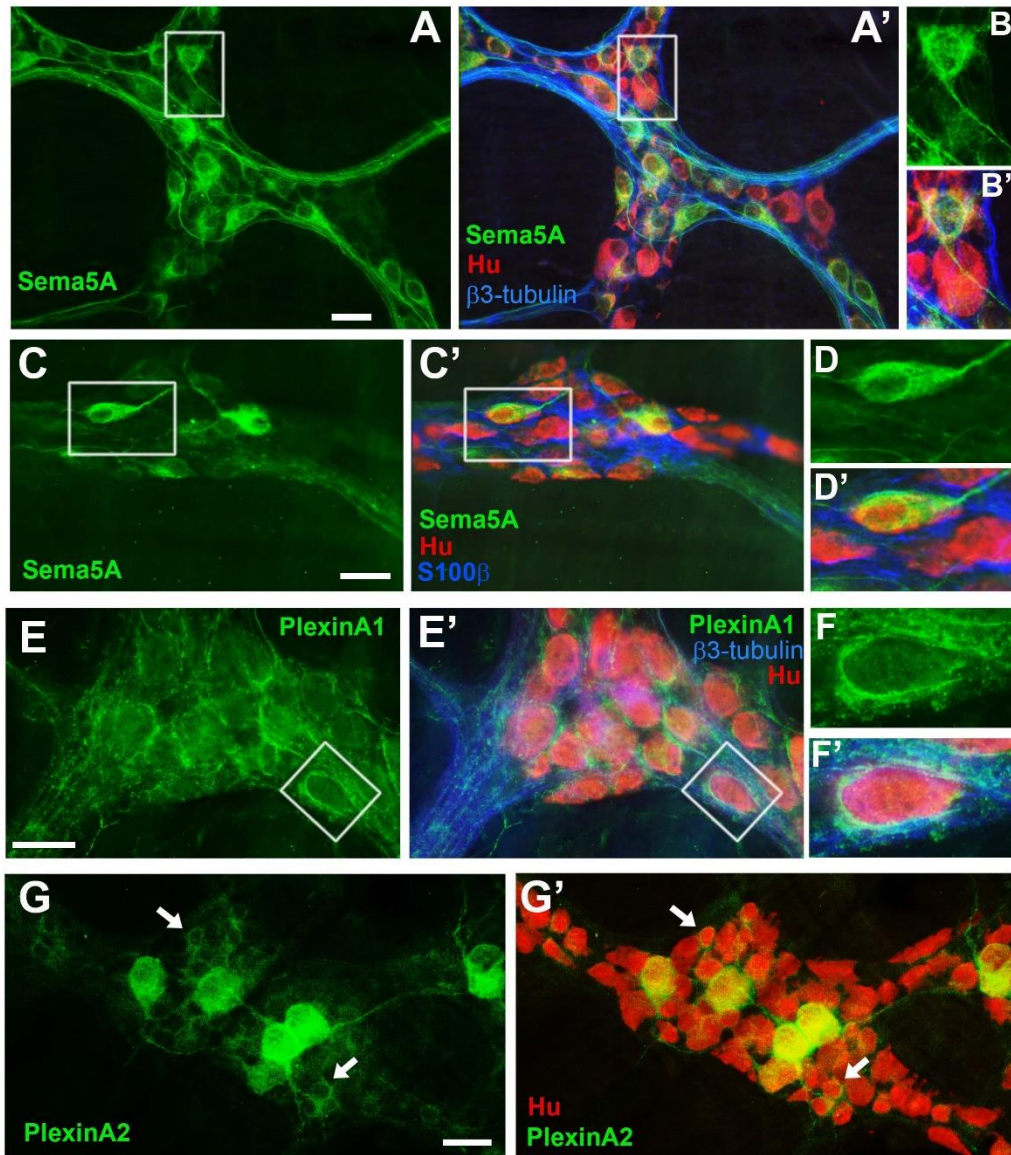


Fig. 2: Sema3A and its receptor Plexin A1 and Plexin A2 are expressed in enteric neurons in the rat distal colon. (A,A',B,B') Triple immunolabeling for Sema5A (green), Hu (marker of neuronal soma, red) and β 3-tubulin (marker of neuronal soma and axonal processes, blue) in the myenteric plexus of rat distal colon. (B,B') Higher magnification of the boxed regions in A,A'. (C,C',D,D') Triple immunolabeling for Sema5A (green), Hu (red) and S100 β (marker of glial cells, blue) in the myenteric plexus of rat distal colon. (D,D') Higher magnification of the boxed regions in C,C'.(E,E',F,F') Triple immunolabeling for Plexin A1 (green), Hu (red) and β 3-tubulin (blue) in the myenteric plexus of rat distal colon. (F,F') Higher magnification of the boxed regions in E,E' illustrates the pericellular Plexin A1 labeling. (G, G') Double immunolabeling for Plexin A2 (green), and Hu (red) in the myenteric plexus of rat distal colon. The arrows point to small-size enteric neurons showing Plexin A2 at the cell border. Scale bars: A: 30 μ m; C- G: 15 μ m.

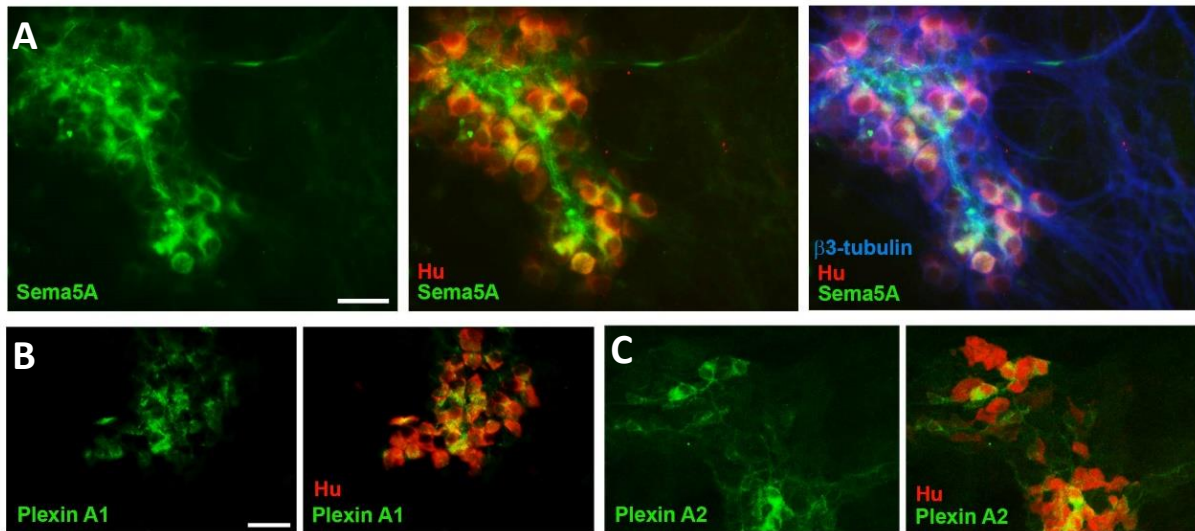


Fig. 3: Sema5A, Plexin A1 and Plexin A2 are expressed in enteric neurons in primary cultures of rat gut. (A) Triple immunolabeling for Sema5A (green), Hu (red) and β 3-tubulin (blue) at 12 days of culture. (B) Double labeling of Plexin A1 (green) with Hu (red) at 12 days of culture. (C) Double labeling of Plexin A2 (green) with Hu (red) at 12 days of culture. Sale bars: 30 μ m.

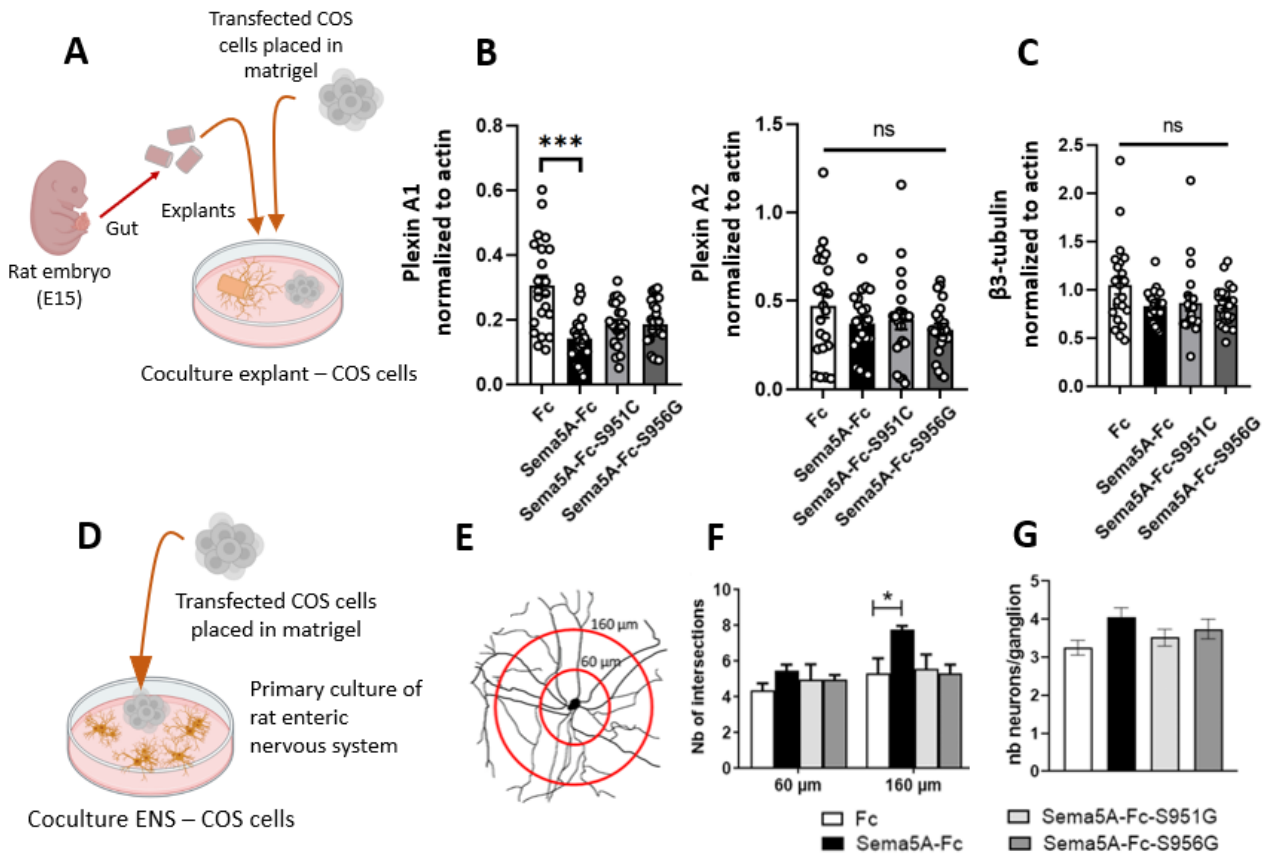


Fig. 4: Sema5A regulates receptor plexin A1 protein expression and stimulates axonal complexity in enteric neurons. (A) Schematic illustrating gut explants cocultured with COS cells expressing Fc, Sema5A-Fc, Sema5A-S951C-Fc or Sema5A-S956G-Fc. Transfected COS cells were placed in matrigel and a drop was deposited in the culture well, next to the explant. 3 days later, explants were subjected to Western blot to analyze the expression of receptors Plexin A1 and A2 **(B)** and axonal protein β3-tubulin **(C)**. Data are mean ± SEM. (n=22 explants from 4 independent experiments); ns p>0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Kruskal–Wallis test, supplemented by Dunn’s post-hoc test. **(D)** To assess complexity of the axonal network, coculture of ENS with transfected COS cells was performed. A drop of COS cells in matrigel is deposited in the center of the ENS culture well and cocultured for 3 days before measuring axonal complexity using Sholl analysis. **(E)** Schematic depicting Sholl analysis. Concentric circles were placed at 60 and 160 μm from the ganglion centre and the number of axonal intersections with each circle was counted. **(F)** Quantification of the number of axonal intersections at 60 and 160 μm from the centre of the ganglion. The number of axonal intersections is increased in the presence of Sema5A-Fc as compared to control Fc without affecting the number of neurons per ganglion **(G)** (*p<0.05, two-way ANOVA with Turkey post-hoc test; n=6 culture wells from 3 independent experiments).

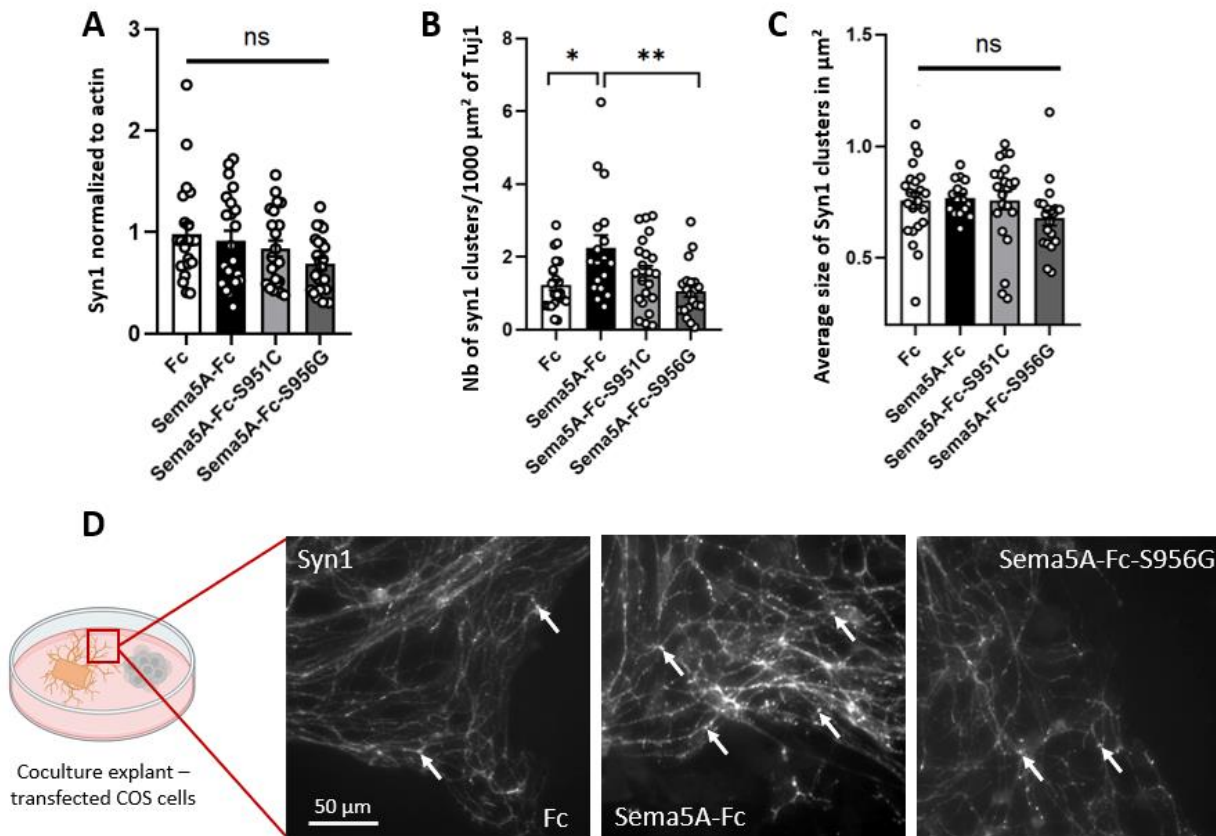


Fig. 5: Sema5A enhances the density of synapsin 1 clusters without affecting synapsin 1 protein expression. (A) Western-blot analysis of explants cocultured with transfected COS show no modulation of pre-synaptic protein synapsin 1. To go further, explants were immunolabeled for synapsin 1 and Tuj1 to assess the density of synapsin 1 clusters, as a relevant marker of synapse density. (B, C) Quantification of the number of synapsin 1 clusters per 100 μm² of Tuj1 labeling (B) and average size of synapsin 1 clusters (C). (D) After 3 days of coculture, the axonal network has spread out of the explants and is accessible for IHC. Representative images of axonal network immunolabeled for synapsin 1. Synapsin 1 clusters are shown by white arrows. Data are mean ± SEM. (Western-blot analysis (A): n=22 explants from 4 independent experiments, IHC (B, C) n=18-23 explants from 6 independent experiments); *p<0.05, **p<0.01, Kruskal–Wallis test, supplemented by Dunn’s post-hoc test.

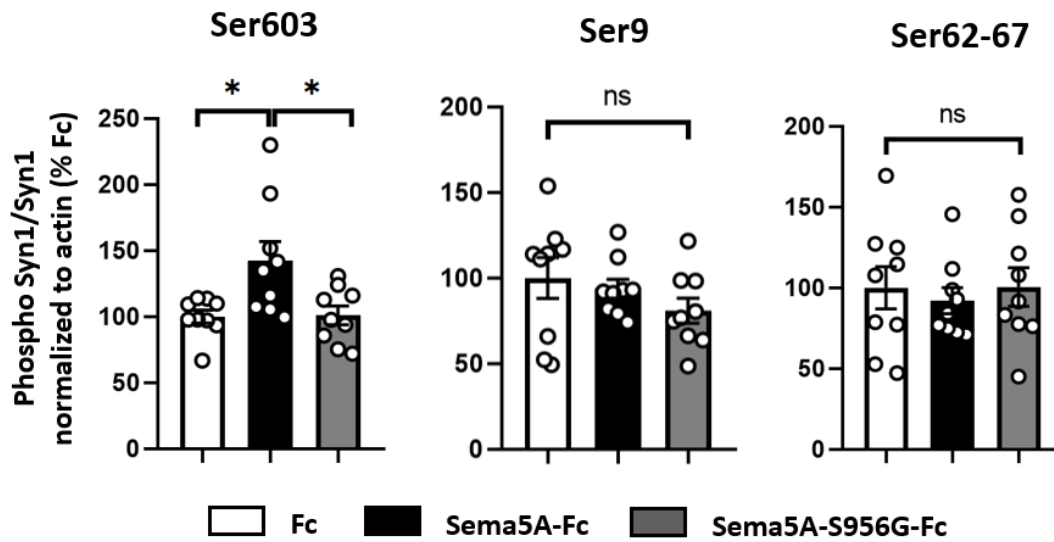


Fig. 6: Sema5A increases enteric neurons synapsin 1 phosphorylation at site Ser-603. Western blot analysis of synapsin 1 phosphorylation at site Ser603, Ser9 and Ser62/67 from enteric neuron cultures treated with Sema5A for 3 days. * $p < 0.05$ Kruskal–Wallis test, supplemented by Dunn’s post-hoc test. Data are mean \pm SEM, $n=8$ cultures from 2 independent experiments.

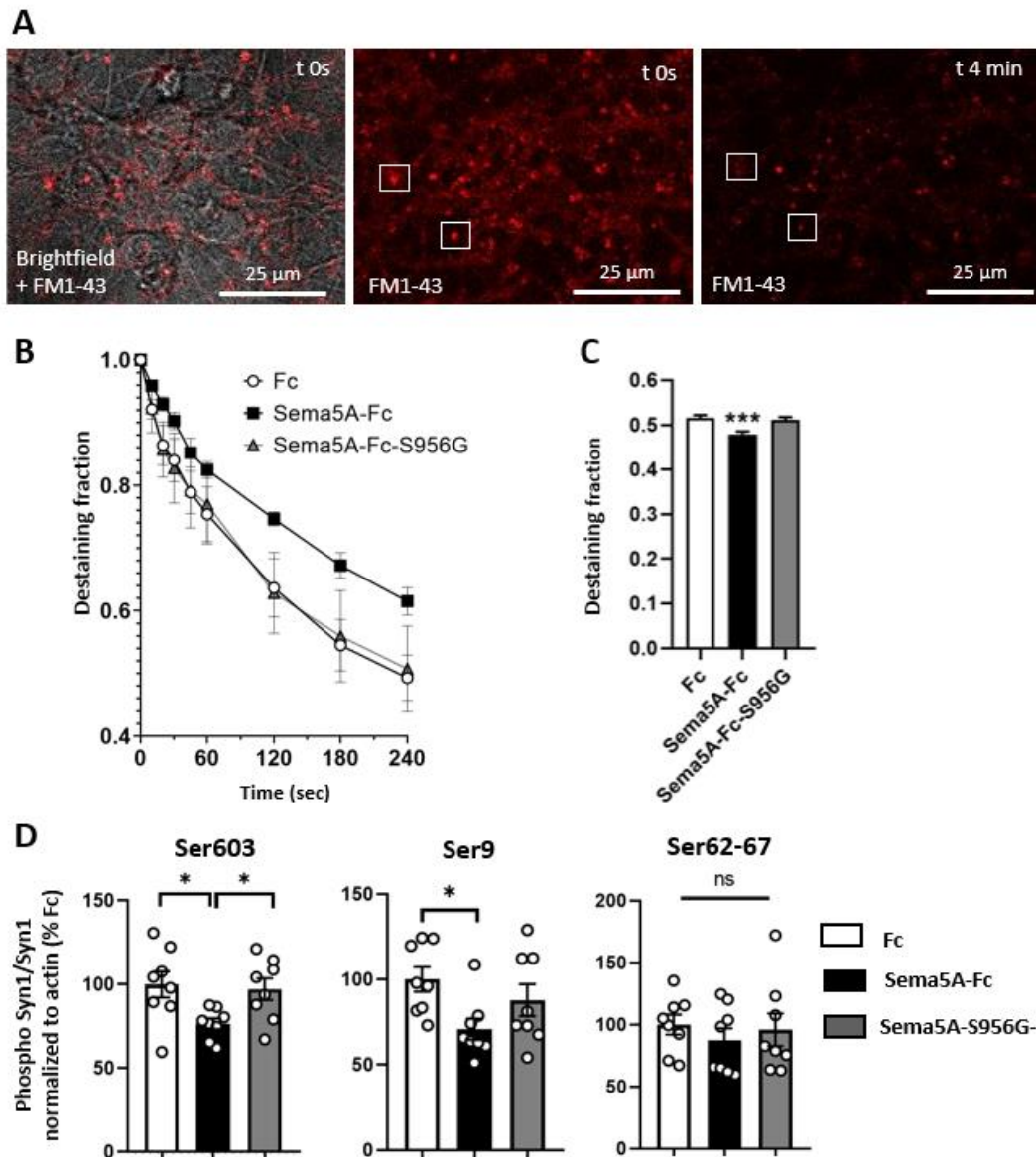


Fig. 7: KCl-induced synaptic vesicle exocytosis is reduced by Sema5A in association with a decrease in synapsin 1 phosphorylation at site Ser-603 and Ser-9. (A) From left to right, merged picture of FM1-43 fluorescence and brightfield microscopy at t0s. Representative images of enteric neurons labeled with FM1-43 at t0s and t4 min after 90 mM KCl stimulation. **(B)** FM1-43 fluorescence decreases over 4 min exposure to 90 mM KCl. **(C)** Remaining fluorescence was measured as destaining fraction, after 4 min exposure to KCl. Destaining fraction of FM1-43 fluorescence is expressed as 1-(Fluo t4 min/Fluo at t0). Data are mean \pm SEM. (n=60 clusters per culture well, from 12 culture wells from 4 independent experiments); ***p<0.001, One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **(D)** Neurons were depolarized by 1 min exposure to 90 mM KCl and collected for Western blot analysis and assessment of synapsin 1 phosphorylation at site Ser-603, Ser-9 and Ser-62/67. *p<0.05 Kruskal–Wallis test, supplemented by Dunn's post-hoc test. Data are mean \pm SEM, n=8 cultures from 2 independent experiments.

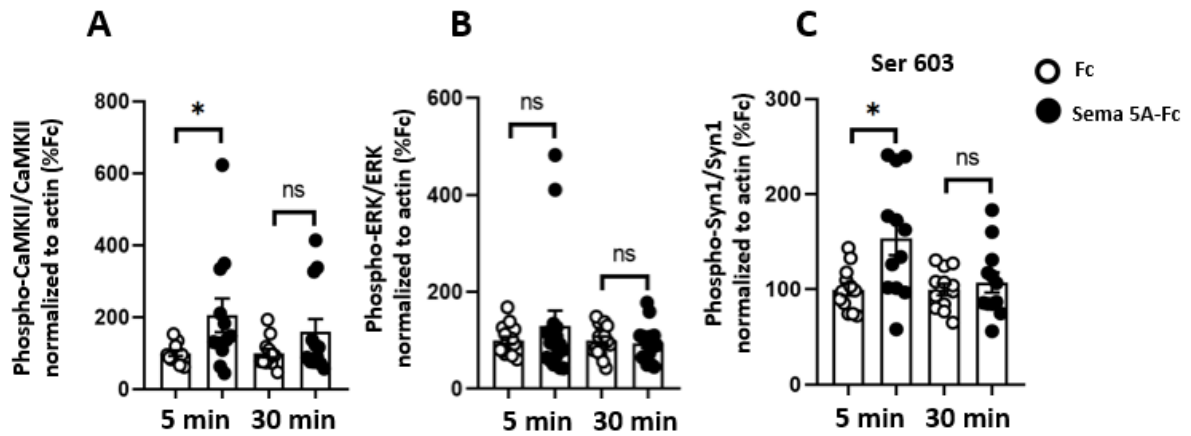


Fig. 8: Enteric neurons exposed to Sema5A for 5 min show increased CaMKII phosphorylation and synapsin 1 phosphorylation at site Ser603. Enteric neurons were treated for 5 min or 30 min with Fc fragment or Sema5A-Fc (4.5 μ M). Western blot for phosphorylated CaMKII at Tyr286 (A), phosphorylated ERK at Thr202/Tyr204 (B) and synapsin 1 at Ser-603 (C). * $p < 0.05$ Mann–Whitney test for each time group. Data are mean \pm SEM, $n = 12$ to 16 cultures from 3 to 4 independent experiments

Supplementary data

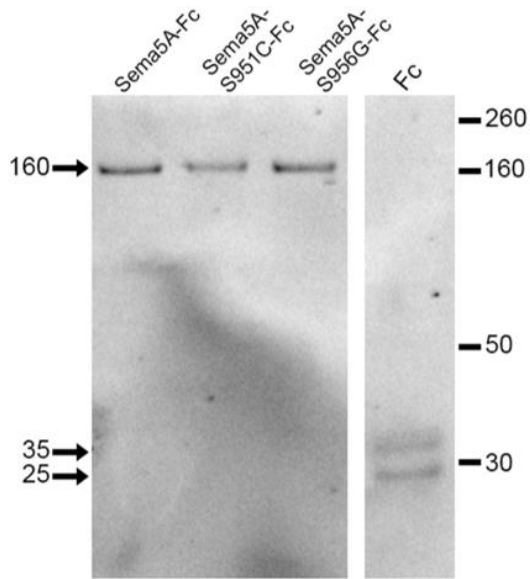


Fig. S1: Fc, Sema5A-Fc and its mutant forms are expressed and secreted in an equivalent amount by transfected COS cells. Western blot of cell culture medium collected from transfected COS cells. For each sample, 13 μ l of culture medium was loaded on the electrophoresis gel and immunoblotted with anti-human IgG Fc antibody.

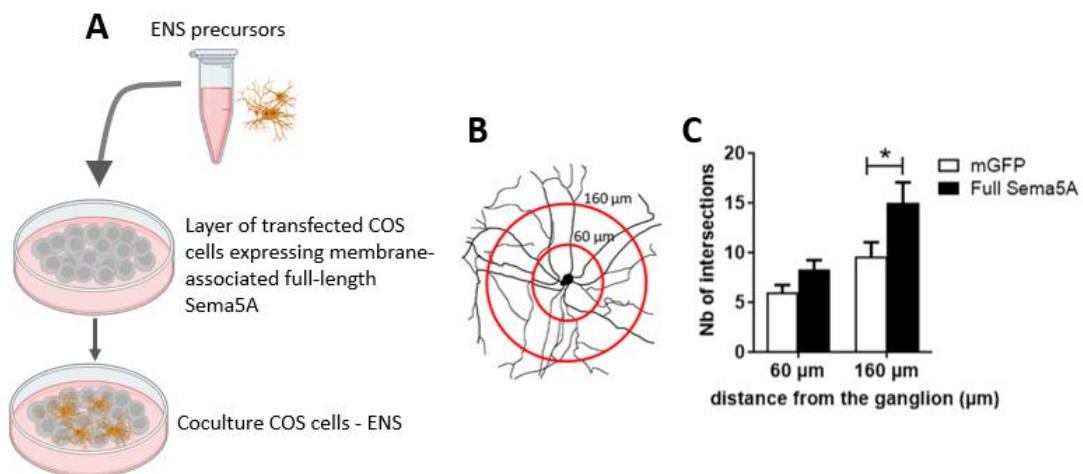


Fig. S2: Full-length membrane-bound form of Sema5A stimulates axonal complexity in enteric neurons.

(A) Schematic summarizing the procedure to favour cell-cell contacts between enteric neurons and COS cells. A first layer of transfected COS cells placed in matrigel is deposited on the well before ENS precursor are seeded to obtain a coculture COS cells -ENS (B) Schematic depicting Sholl analysis. Concentric circles were placed at 60 and 160 μ m from the ganglion centre and the number of axonal intersections with each circle was counted. (C) Quantification of the number of axonal intersections at 60 and 160 μ m from the centre of the ganglion. The number of axonal intersections is increased in the presence of the full-length membrane-associated form of Sema5A as compared to mGFP at 160 μ m from the centre of the ganglion (* p <0.05, two-way ANOVA with Turkey post-hoc test; n =8 culture wells from 3 independent experiments).

Supplementary data

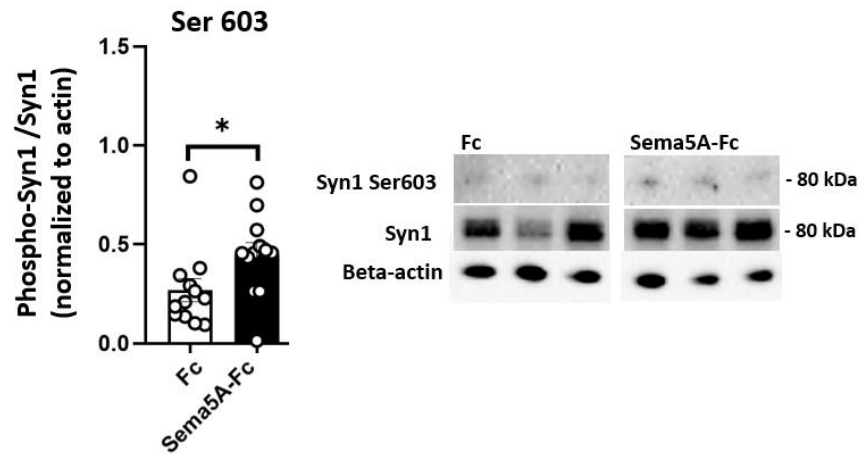


Fig. S3: Sema5A increases synapsin 1 phosphorylation on site Ser-603 in a rat gut explant model.

Western-blot analysis of explants cocultured for 4 days with transfected COS cells expressing Fc or Sema5A-Fc. * $p < 0.05$ Mann-Whitney test. Data are mean \pm SEM, $n = 11$ explants from 2 independent experiments.

Article 3

The microbiota-derived metabolite deoxycholic acid is associated with autism spectrum disorder and regulates enteric neuron activity and connectivity.

Morgane E Le Dréan^{1*}, Justine Marchix¹, Martial Caillaud¹, Maëva Rebion¹, Catherine Le Berre-Scoul¹, Philippe Hulin², Magalie Feyeux², Antonin Lamazière³, Marion Leboyer^{4,5,6},
Sophie Talon¹ Michel Neunlist¹, and Hélène Boudin^{1*}

(Article en preparation)

The microbiota-derived metabolite deoxycholic acid is associated with autism spectrum disorder and regulates enteric neuron activity and connectivity.

Morgane E Le Dréan^{1*}, Justine Marchix¹, Martial Caillaud¹, Maëva Rebion¹, Catherine Le Berre-Scoul¹, Philippe Hulin², Magalie Feyeux², Antonin Lamazière³, Marion Leboyer^{4,5,6}, Sophie Talon¹ Michel Neunlist¹, and Hélène Boudin^{1*}

¹ Nantes Université, INSERM, The enteric nervous system in gut and brain disorder, F-44000 Nantes, France

² Plateforme MicroPICell Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, BioCore, US16, SFR Bonamy, Nantes, France

³ INSERM UMR S 938, Département METOMICS, Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université, AP-HP, F-75012 Paris, France.

⁴ Fondation FondaMental, 94000 Créteil, France

⁵INSERM U955 Neuro-Psychiatrie Translationnelle, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, 94010 Créteil, France

⁶AP-HP, Département médico-Universitaire d'Addictologie et de Psychiatrie des Hôpitaux Henri Mondor, Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, France

*corresponding authors: Hélène Boudin: helene.boudin@univ-nantes.fr and Morgane E. Le Dréan: morgane.ledrean@univ-nantes.fr

Summary

Autism spectrum disorders (ASD) are neuro-developmental disorders defined by lack of social skills, repetitive behaviors and restricted interests. Beside behavioral symptoms, ASD is highly associated with gastrointestinal (GI) symptoms. As a key regulator of GI functions, the enteric nervous system (ENS) might be a prime target in ASD that remains however understudied in the context of ASD. Moreover, gut microbiota dysbiosis is an important cofactor in ASD raising the hypothesis that microbiota-derived metabolites could contribute to the pathophysiology of ASD. In this study, we analyzed the fecal content of secondary bile acids in adult ASD individuals compared to NT adults and studied the role of selected secondary bile acids on enteric neuron functions. Our findings demonstrated a striking elevated concentration of DCA and HDCA in fecal samples from females with ASD, but not males, compared to NT group. Further studies on the role of DCA on rat enteric neurons in culture indicated that this microbiota-derived metabolite impact spontaneous neuronal activity and increased stimulated synaptic vesicle exocytosis. This study highlights the potential importance of DCA in ENS functions that might connect microbiota dysbiosis and GI symptoms in autism.

INTRODUCTION

Autism spectrum disorders (ASD) are neuro-developmental disorders defined by lack of social skills, repetitive behaviors and restricted interests. The prevalence of ASD continues to increase in the world, rising from 0.02% in 1975 to the present value of 1.2 % (Zeidan et al., 2022). Despite increasing world awareness, there are no specific drugs available to treat the core symptoms of ASD and major gaps remain in our understanding of pathophysiological mechanisms underlying ASD, which involve both genetic and environmental factors. Beside behavioral symptoms, ASD is associated with a wide range of comorbidities including seizure, sleep disorders, intellectual disability and gastrointestinal (GI) symptoms. These later, mostly diarrhea, constipation, abdominal discomfort and bloating, are particularly prominent in ASD with a frequency shown to be 4.4 times more elevated in ASD children than neurotypical (NT) children (McElhanon et al., 2014). Further highlighting the importance of the gut in ASD is the correlation between the severity of ASD-related behavior and of GI symptoms (Adams et al., 2011), suggesting that common mechanisms could contribute to gut and brain dysfunctions. As a key regulator of GI functions, the enteric nervous system (ENS) might be a prime target in ASD. The ENS is distributed throughout the digestive tract and is composed of a complex network of enteric neurons and glial cells. The establishment of enteric neuronal activity and connectivity during development underlies the maturation of ENS functions (de Vries et al., 2010; Gonzales et al., 2020; Le Berre-Scoul et al., 2017; Li et al., 2019) and defects in neuronal connectivity are associated with gut disorders, as shown for instance in irritable bowel syndrome and Hirschsprung's disease (Dothel et al., 2015; Gonzales et al., 2020; Sasselli et al., 2013). Regarding ASD, genetic animal models of ASD pointed to structural alterations of the enteric neuronal network, such as changes in the number of enteric neurons, the proportion of specific neuronal populations and the pattern of neuronal network (Bernier et al., 2014; Golubeva et al., 2017; Hosie et al., 2019; Leembruggen et al., 2020; Margolis et al., 2016).

Accumulating evidence unveiled dysbiosis of the gut microbiota as an important cofactor in ASD. Changes in the composition of fecal microbiota have been reported in children and adults with ASD compared to NT individuals and transfer into mice of fecal supernatant or of gut microbiota from people with ASD induced behavioral alterations and gut dysfunctions relevant to ASD-associated symptoms (Gonzales et al., 2021; Sharon et al., 2019; Xiao et al., 2021). However, the mechanisms of gut microbiota-mediated effects on gut and brain are still largely unknown, but might involve microbiota-derived metabolites. In particular, increased fecal concentration of several bacterial metabolites, including short chain fatty acids (SCFAs) (Wang et al., 2012), indole and its derivatives (De Angelis et al., 2013) and para-cresol (De

Angelis et al., 2013) have been described in children with ASD, making them potential microbiota-host mediators in ASD. However, another class of bacterial metabolites, the secondary bile acids, has been little explored in human fluids in the context of ASD although several evidences point to a potential role of this class of compounds in ASD. Secondary bile acids are produced by gut microbiota upon biotransformation of primary bile acids, themselves synthesized through cholesterol metabolism in the liver. Bile acids are implicated in the solubilization of dietary lipids but are also regarded as signaling molecules through activation of bile acid receptors such as farnesoid X receptor (FXR) and TGR5 (Monteiro-Cardoso et al., 2021). As such, secondary bile acids have been proposed as modulators of the microbiota-gut-brain axis. The BTBR mouse model of idiopathic ASD showed modifications of the fecal content of several bile acids, including secondary bile acids (Golubeva et al., 2017). Moreover, the administration of a FXR agonist alters microbiota composition and alleviates autism-associated behaviors (Liu et al., 2022). On the other hand, it is worth noting that the studies in human aiming in the characterization of microbial metabolites in ASD all focused on pediatric or adolescent populations raising the need to move forward to also consider adult ASD individuals.

In this study, we first analyzed the fecal content of secondary bile acids in adult ASD individuals compared to NT adults and studied the role of selected secondary bile acids on enteric neuron functions. Our findings demonstrated a striking elevated concentration of DCA and HDCA in fecal samples from females with ASD, but not males, compared to NT group. Further studies on the role of DCA on rat enteric neurons in culture indicated that this microbiota-derived metabolite impact spontaneous neuronal activity and increased stimulated synaptic vesicle exocytosis. This study highlights the potential importance of DCA in ENS functions that might connect microbiota dysbiosis and GI symptoms in autism.

MATERIALS AND METHODS

Participants, fecal samples collection and analyses of secondary bile acids

Participants were recruited through the Autism Expert Center, FondaMental foundation (Chenevier–Mondor Hospital in Créteil, France) according to the approval from the French Ethical Committee for Biomedical Research (Comité de Protection des Personnes Ile de France V) as of 02/02/2016 through the protocole 2013-A01286-39 registered under no. 16113 with the collection code DC 2009-930. Adults with ASD and without intellectual disability were diagnosed according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental-4-revised (DSM-IV R) criteria and the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) scores. Subjects were not eligible for the study if they had been on antibiotics or antifungal agents within the preceding eight weeks. Fecal samples were collected by individuals at home with the GENboxanaer kit (ref 96124, Biomérieux, France), stored immediately at 4°C, and brought to the Centre d'Investigation Clinique of Créteil hospital in less than 24 h. Each sample was aliquoted to 1g per tube and stored at -80°C before use. For this study, fecal samples were collected from 19 neurotypical adults aged 18 to 50 years of age (9 females, 10 males) and 42 adults with ASD without intellectual disabilities aged 18 to 50 years of age (15 females, 27 males).

The fecal content of the primary bile acids cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) as well as the secondary bile acids deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA), hyodeoxycholic acid (HDCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA) were analyzed by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrophotometer (UPLC–MS/MS; Platform B2R, Hôpital Saint Antoine, Paris, France).

Animals.

Pregnant Sprague-Dawley rats were purchased on gestational day 15 (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France). Dams were anesthetized by isoflurane, euthanized by cervical dislocation and the embryos (at embryonic day 15, E15) were collected to proceed to cell culture. All protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement # 02476.01).

Enteric neuron culture.

Primary culture of rat enteric neuron was performed as previously described in Caillaud et al., 2023. Briefly, the intestine of E15 rat embryos were cut into 8 pieces of equal length and placed in a well of a 24-well culture plate previously coated with collagen type I (354236, Corning). After 5 days of culture in enteric glia-conditioned DMEM medium containing GDNF

(50 ng/mL) (R&D Systems - bio-technie), the explants were delicately removed and the cells having migrated out of the explants were detached with Accutase (07920, StemCell technologies, Saint-Egrève, France). Accutase is then inhibited in DMEM medium, the cells centrifuged (1200rpm, 5 min at RT) and the pellet suspended in enteric glia-conditioned DMEM medium + GDNF (50 ng/mL). Cells were then plated (day 0) either in Ibidi 24-well plates (ibidi, Gräfelfing, Germany) for FM1-43 and Cal520 imaging or in 24-well plastic culture plates for western blot analyses. The next day (D1), the antimitotic agent cytosine arabinoside (ARA-C at 5 μ M) was added to prevent proliferation of glial and muscle cells.

Secondary bile acids preparation.

Bile acids solutions were prepared from powder dissolved in DMSO. 25 mM solution of DCA (30960, Sigma-Aldrich), HDCA (H3878-5G, Sigma-Aldrich), LCA (L6250-10G, Sigma-Aldrich) and UDCA (U5127-1G, Sigma-Aldrich) were prepared in DMSO (D2650, Sigma-Aldrich) then diluted to 100 μ M in HBSS. Bile acids solution in HBSS were filtered in 0,22 μ m syringe filter (514-1263, Avantor). In a 1 mL P24 well, 10 μ L of the 100 μ M solution was added in the culture well (1 mL in 24 wells plates) to achieve a final concentration of 1 μ M in the culture well.

Cells treatments.

Secondary bile acids: Neurons were treated with 1 μ M of DCA, HDCA, LCA, UDCA or 0.4% DMSO (vehicle) two days after plating (D2), and five days after plating (D5). On day 6, neurons were used for the different experiments. For acute exposition to secondary bile acids, neurons were treated at D6 with 1 μ M of DCA, HDCA, LCA, UDCA or the vehicle for 5 min before collection in RIPA lysis buffer for western-blotting analysis

KCl: To assess synapsin 1 phosphorylation state of enteric neurons in stimulated conditions elicited by KCl-induced depolarization, D6 enteric neurons chronically exposed to bile acids, were stimulated for 60 sec in stimulation buffer, containing 90 mM KCl (cf. FM1-43) and rested for 5 min in Ca²⁺-free washing buffer before collection in RIPA lysis buffer for western-blotting analysis.

Western blot.

Protein collection: Cells were gently scrapped in 50 μ L RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail, 2 mM orthovanadate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma-Aldrich), and were sonicated.

Electrophoresis, transfer and antibody incubation. Samples were further prepared for electrophoresis by adding adjusted volume of NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (NP0007 Thermo Fisher Scientific) and NuPAGE™ Sample Reducing Agent 10X (NP0009 Thermo Fisher Scientific) and were then heated at 95°C for 5 min and loaded onto a NuPAGE 4-12% Bis-Tris Acrylamide gel (NP0322BOX Thermo Fisher Scientific) with MES SDS Running Buffer (NP0002 Thermo Fisher Scientific). Loading was 1/10 of culture well. Electrophoretic transfer to nitrocellulose membrane was performed with iBlot Nitrocellulose Transfer stack mini (IB23002 Thermo Fisher Scientific) for 7 minutes at 20 V in an iBlot dry transfer apparatus (IB21001 Thermo Fisher Scientific). Membranes were incubated for 1h in blocking solution composed of Tris-buffered saline (TBS), 0.1% (v/v) Tween-20 and 5% (w/v) non-fat powder milk and were then incubated overnight at 4°C in primary antibodies as follows: rabbit monoclonal anti-synapsin 1 (1:1000, # 5297 Cell Signaling), mouse monoclonal anti-beta-3-tubulin (1:1000, # T8660 Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-phospho-synapsin 1 (Ser62/67) (1:1000, # 11583501 Thermo Fisher Scientific), rabbit polyclonal anti-phospho-synapsin 1 (Ser603) (1:1000, # PA1-4604 Thermo Fisher Scientific), rabbit polyclonal anti-phospho-synapsin 1 (Ser9) (1:1000, # CST2311 Cell Signaling), mouse monoclonal anti-PGP 9.5 (1:1,000, MA1-83428, Thermo Fisher Scientific), mouse monoclonal anti-PSD95 (1:1000, ref: MA1-045, ThermoFisher), rabbit monoclonal anti-CREB (1:1000, # 9197S Cell Signaling), rabbit monoclonal anti-Phospho-CREB (Ser133) (1:1000, # 9198S Cell Signaling), mouse monoclonal anti-Synaptophysin (1:1000, # 12270S Cell Signaling), mouse monoclonal anti-nNOS (1:1000, #6103308, BD Biosciences) and mouse monoclonal anti- β -Actin (1:5000, # A5441 Sigma-Aldrich). Membranes were washed thoroughly with TBS and incubated for 1h with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP) diluted in TBS + 5% non-fat powder milk. Proteins were detected by chemiluminescence with Clarity Western reagents (1705061, Bio-Rad, Marnes la coquette, France) using a ChemiDoc XRS+ system (1708265, Bio-Rad). The ubiquitous protein β -Actin was revealed and used as reference proteins for loading control and normalizing factor for each deposit. For quantification, the relevant immunoreactive bands were selected and quantified with Image Lab software version 5.0 (Bio-Rad). Data are expressed as relative values to β -Actin normalized to the control mean.

FM1-43 imaging

Enteric neurons were incubated for 60 sec at 37°C with 5 µg/mL of FM 1-43 (Molecular Probes) diluted in stimulation buffer composed of 31.5 mM NaCl, 90 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 25 mM HEPES, 30 mM glucose, pH 7.4. Enteric neurons were then washed for 15 min at 37°C in Ca²⁺-free washing buffer (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, and 30 mM glucose, pH 7.4). Dynamic acquisition was performed using a scanning confocal microscope NIKON A1 RSi (Nikon, Tokyo, Japan) with an oil-immersion objective (×63, NA, 1.40). Preparations were imaged during 4 min in stimulation buffer using Galvano mode at 1 fps (excitation :48nm, emission: 530 +/- 20 nm) by NIS-Element software. The fluorescence intensity of FM1-43 clusters was analyzed using the Fiji software. The destaining fraction after 4 min was calculated for each cluster using the formula: $1 - (\text{Fluo at 4min} / \text{Fluo at 0s})$.

Calcium imaging

Calcium imaging was performed as described in Caillaud et al., 2023, using Cal-520, AM dye (Abcam, Cambridge, UK) in Ibidi 24-well plates (µ-Slide 24 Well, Gräfelfing, Germany). Neurons were loaded into glia-conditioned medium supplemented with Cal-520 AM dye (5 µM) for 60 min at 37°C in a cell culture incubator. High-frame-rate (60 fps) images were recorded using a resonant scanning NIKON A1 RSi confocal microscope (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) with a dedicated oil immersion objective (×63, NA, 1.40) and a temperature (37°C)/CO₂ (5%) controller. The dye was excited by a laser source at 488 nm and the fluorescence signal was recorded at 520 nm. Video acquisition was performed using the Nikon imaging software NIS-Elements. We analyzed the images using the ImageJ software. The fluorescence intensity was measured in region of interest (ROI) delimitating neuronal cell bodies for spontaneous activity and upon pharmacological stimulations. Data were represented as changes in fluorescence intensity according to the formula $1F = F/F_0$, where F_0 is the minimum fluorescence intensity. Amplitude and frequency of calcium transients were identified using an Excel macro specifically designed for calcium imaging spontaneous activity analysis and created by Magalie Feyeux at the Plateforme MicroPICell in Nantes

Statistical analysis

GraphPad Prism 8 was used for conducting the statistical analysis and data interpretation. Data are presented as mean ± SEM. Group comparisons were executed by first, assessing normal distribution and deploying, accordingly, the t-test or one-way ANOVA or parametric tests or the Mann-Whitney test or Kruskal–Wallis test supplemented by Dunn’s post-hoc test for non-parametric tests. Statistical significance thresholds were set as “ns” (non-significant) for p-value > 0.05, * for p-value <0.05, ** for p-value <0.01 and *** for p-value <0.001.

RESULTS

Fecal content of DCA and HDCA differs between NT and ASD only in females

Fecal samples from 19 NT adults and 42 adults with ASD were analyzed for primary (CA and CDCA) and secondary bile acids DCA, HDCA, LTA and UDCA. No difference was observed between the two groups for all the studied primary (not shown) and secondary bile acids except for HDCA (Fig. 1A). Upon stratification for females and males, we found that the fecal contents of DCA and HDCA were increased in female with ASD as compared to NT female, while no difference was observed between NT and ASD males (Fig. 1B). Interestingly, when considering NT individuals, fecal levels of DCA and HDCA were lower in females than males whereas similar levels of DCA and HDCA were found between females with ASD and males, regardless of being NT or ASD (Fig. 1B). These results suggest a female-specific increased of DCA and HDCA fecal content in ASD.

DCA increases CREB phosphorylation and regulates the spontaneous activity of enteric neurons

Given that gut disorders have been consistently reported in people with ASD, our findings showing increased levels of DCA and HDCA in fecal samples from females with ASD prompted us to study the impact of these secondary bile acids on the ENS, a key regulator of digestive tract functions. It has been reported that enteric neurons express the bile acid receptor TGR5 (Poole 2010), and that TGR5 activation increases intracellular concentrations of cAMP leading to PKA-dependent phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein (CREB) (Biagioli et al., 2017). To assess the ability of the secondary bile acids to induce CREB phosphorylation in enteric neurons, cultured enteric neurons were treated with DCA, HDCA, LCA and UDCA for 5 min to analyze by western blot the level of phospho-CREB at Ser133. We found that DCA, but not HDCA, LCA or UDCA, promoted an increased phosphorylation of CREB (Fig. 2). This selective effect of DCA on CREB phosphorylation, compared to the other secondary bile acids, led us to further study the effects of DCA on enteric neuron functions. CREB activation through phosphorylation play important roles on the regulation of neuronal proteins expression (Lonze and Ginty, 2002). We thus examined in enteric neuron cultures the effects of DCA treatment during 4 days, on several neuronal protein expression (Fig. 3A). Synapsin 1 and synaptophysin, that are both key presynaptic proteins, were upregulated by DCA compared to vehicle treatment (Fig. 3B). No change in the expression of the postsynaptic protein PSD95 was observed between the two groups (Fig. 3B). We also analyzed the expression of the axonal structural protein Beta-3-tubulin and found a decreased expression in enteric neurons chronically treated with DCA (Fig. 3B). Regarding the expression of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS), producing the neurotransmitter NO and functionally

linked to CREB activity (Riccio et al., 2006), no change was induced by DCA (Fig. 3B). Because CREB activation through phosphorylation is stimulated by increased neuronal activity (Moore et al., 1996), the effects of DCA on spontaneous neuronal activity was studied on cultured enteric neurons by Ca^{2+} imaging. Enteric neurons treated for 4 days with DCA exhibited an enhanced frequency of Ca^{2+} transients along with a decreased amplitude as compared to neurons treated with vehicle (Fig. 4).

DCA affects synaptic functions of enteric neurons

The DCA-induced increase of presynaptic protein expression in enteric neurons led us to further study the impact of DCA presynaptic mechanisms. To this aim, we studied the role of DCA on synaptic vesicle exocytosis in enteric neurons by imaging-based approach using the dye FM1-43 as previously described (Betz et al., 1996; Boesmans et al., 2008; Caillaud et al., 2023). After loading the dye FM1-43 in synaptic vesicles, subsequent KCl-induced depolarization of enteric neurons resulted in dye destaining as synaptic vesicles fused with the plasma membrane of nerve terminals and released the dye (Fig. 5A). The loss of FM1-43 staining induced by neuronal depolarization during the 4 min of recording was increased in enteric neurons that were pretreated by DCA as compared to control condition (Fig. 5B). Measurements of the fluorescence intensity of FM1-43 clusters 4 min after the application of KCl showed that the destaining fraction of FM1-43 was enhanced by DCA treatment (Fig. 5C). Next, the level of synapsin 1 phosphorylation, one of the main molecular switch regulating clustering and release of synaptic vesicles (Zhang and Augustine, 2021), was assessed in enteric neurons chronically treated with DCA. Synapsin 1 phosphorylation was studied using site-specific phospho synapsin 1 antibodies for phosphorylation at Ser603 and Ser9, shown to trigger synapsin 1 dissociation from synaptic vesicles (Chi et al., 2001, 2003) and at Ser62/67, implicated in synapsin 1 dissociation from actin filaments (Jovanovic et al., 1996). Treatments for 4 days with DCA showed no effect on synapsin 1 phosphorylation levels at any of the studied phosphorylation sites (not shown). Next, following the same DCA treatment for 4 days, enteric neurons were stimulated by KCl-induced depolarization (1 min) to promote synaptic activity, or PBS for control (Fig. 6). We found that neuronal depolarization performed on neurons pretreated by DCA had no effect on synapsin 1 phosphorylation at Ser603 and Ser9, but induced an increased level of phosphorylation at Ser62/67 compared to control (enteric neurons pretreated with the vehicle). PBS-induced stimulation used as control did not induce any syn1 phosphorylation in neurons pretreated with DCA or the vehicle. Phosphorylation at sites 62/67 has been shown to weaken the binding of synapsin 1 to actin cytoskeleton, thereby facilitating the turn-over of synaptic vesicles at the active zone (Jovanovic et al., 1996; Matsubara et al., 1996). These results suggest that DCA enhanced synaptic vesicle exocytosis upon neuronal stimulation potentially by promoting synapsin 1 phosphorylation at Ser62/67.

DISCUSSION

In this study we found a sex-specific increase of the microbiota-derived metabolites DCA and HDCA in females patients with ASD compared to NT groups and provide evidence that DCA might directly impact enteric neuron activity and connectivity. Specifically, application of DCA to enteric neuron cultures enhanced CREB phosphorylation, spontaneous neuronal activity and synaptic vesicle exocytosis potentially through the regulation of synapsin 1 phosphorylation. Our results identified DCA as an ASD-associated bacterial metabolite that might connect microbiota dysbiosis and GI symptoms in ASD.

Regarding the concentration of bile acids in fecal samples, differences were observed for the secondary bile acids DCA and HDCA between females and males. First, when considering the NT population, females contained a lower concentration of DCA and HDCA than males as previously described (Lampe et al., 1993). Sexual dimorphism in bile acid synthesis and metabolism has also been reported in rodent and have been attributed to differences in gut microbiota composition and sex hormone influence (Phelps et al., 2019). More importantly, we found a higher concentration of DCA and HDCA in fecal samples from females with ASD compared to NT females. These effects were selectively observed in females but not in males who had similar fecal concentrations of these secondary bile acids in NT and ASD groups. The increased of DCA and HDCA observed in female with ASD might be attributable to sex-specific gut microbiota composition, as secondary bile acids derived from microbiota metabolism. While distinct gut microbiota composition has been documented between male and female individuals (Kim et al., 2020; Mueller et al., 2006), sex differences in ASD-associated microbiota has been understudied. A recent meta-analysis of fecal microbiome in ASD revealed sex-dependent differences in several bacterial taxa (Morton et al., 2023; West et al., 2022). Moreover, mouse models of ASD showed sex-specific differences in fecal microbiota and metabolites as shown in the valproic acid and BTBR models (Coretti et al., 2017; Gu et al., 2021). Interestingly, in this later mouse model, it has been shown that the relative abundance of the bile acid-metabolizing bacteria *Bifidobacterium* and *Blautia* was associated with altered secondary bile acid content in plasma and feces (Golubeva et al., 2017). Therefore, the specific increase of DCA and HDCA reported in our study in the female group with ASD might be a consequence of a differential microbiota profile between females and males. Our results also strengthen the importance to consider sex-specific subgroups in future studies on ASD.

As natural acting detergents, the role of bile acids have long be limited to fat absorption during digestion. However, they are now recognized as important signaling molecules participating in several GI functions, including motor and sensory functions as well as intestinal

barrier permeability. In this respect, we found that DCA was able to directly regulate the spontaneous activity of enteric neurons as manifested by DCA-induced changes of Ca^{2+} transient pattern characterized by increased frequency and lower amplitude. Spontaneous Ca^{2+} transients have been detected previously in enteric neuron cultures (Caillaud et al., 2023) and in myenteric ganglia from *ex vivo* preparation of mouse colon (Gould et al., 2019; Margiotta et al., 2021). These Ca^{2+} transients have been attributed to single action potentials and even subthreshold membrane depolarization (Li et al., 2022) that could be elicited through impulse-driven presynaptic activity and subsequent activation of postsynaptic acetylcholin or serotonin receptors on cholinergic neurons (Margiotta et al., 2021). Our results showing an increased frequency of Ca^{2+} transients induced by DCA might therefore arise from increased presynaptic activity. Accordingly, we found that DCA induced an increase of synaptic vesicle exocytosis induced by KCl depolarization. The molecular mechanisms regulating synaptic vesicle exocytosis involve a large array of protein-protein interactions, assembly and disassembly of diverse molecular complexes. Among this molecular machinery, synapsin 1, a primary component of synaptic vesicles, plays a central role. Through phosphorylation-dependent interactions with synaptic vesicles and the actin cytoskeleton, synapsin 1 regulate synaptic vesicle clustering at the active zone (Chi et al., 2003; Greengard et al., 1993). We found that DCA enhanced phosphorylation of synapsin 1 at site Ser62/67 without affecting the phosphorylation at sites Ser9 and Ser603. These three phosphorylation sites promote the availability of synaptic vesicles at the active zone for exocytosis, although through different mechanisms. Phosphorylation at Ser62/67, achieved by mitogen-activated protein kinase, promotes the dissociation of synapsin 1 from actin cytoskeleton (Jovanovic et al., 1996), thereby liberating synaptic vesicles for their exocytosis at presynaptic terminal. By enhancing Ser62/67 phosphorylation, DCA might favor synaptic vesicle exocytosis by specifically reducing the interactions between synapsin 1 and the actin cytoskeleton. The effects of DCA on enteric neuron activity and synaptic strength might underlie some of the previously reported DCA-induced regulation of intestinal permeability and motility. Administration of DCA to rats or mice has been shown to increase intestinal epithelial barrier permeability in colonic and jejunal tissues and to decrease spontaneous activity of ileum and colonic tissues through neurally-mediated mechanisms (Forsgard et al., 2014; Poole et al., 2010; Sun et al., 2004). Our results suggest that DCA could influence gut functions through its modulation of enteric neuron activity and synaptic strength. Given the impact of DCA on gut and enteric neuron functions, the selective increase of DCA in fecal samples of woman with ASD shown in our study led to the hypothesis that GI symptoms might be different between females and males with ASD. In agreement with this hypothesis, female autistic children have significantly higher odds of experiencing GI disorders than their male counterparts (Angell et

al., 2021). However, no studies were conducted so far to examine whether the types of GI symptoms associated to ASD are sex-specific.

Beyond its roles on gut and enteric neuron functions, DCA might also impact cerebral functions and thereby potentially contribute to behavioral symptoms. Central neurons express the bile acid receptors FXR and TGR5 (Mertens et al., 2017). Unconjugated bile acids, such as DCA, can cross the blood brain barrier by passive diffusion (Kiriya and Nochi, 2019) and, when present in the bloodstream, may also affect the blood brain barrier permeability (Quinn et al., 2014). Whether DCA might also affect synaptic functions in brain neurons similarly as enteric neurons remains to be studied.

Acknowledgements

We thank M Mantel, L Huguet and L Bouteillé for initial experiments. This work was supported by FondationSanteDige, Inserm, Région Pays de la Loire (Enterautisme, ExtraNeuro), ANR MicrobiAutism (ANR-10-INBS-04) and ANR ExtraNeuro (ANR-22-CE14-0043). MELD was supported by a fellowship from the French Ministry of higher education, research and innovation.

References

- Adams, J.B., Johansen, L.J., Powell, L.D., Quig, D., Rubin, R.A., 2011. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology* 11, 22.
- Angell, A.M., Deavenport-Saman, A., Yin, L., Zou, B., Bai, C., Varma, D., Solomon, O., 2021. Sex Differences in Co-occurring Conditions Among Autistic Children and Youth in Florida: A Retrospective Cohort Study (2012-2019). *Journal of autism and developmental disorders* 51, 3759-3765.
- Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stessman, H.A., Coe, B.P., Penn, O., Witherspoon, K., Gerds, J., Baker, C., Vulto-van Silfhout, A.T., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., Fichera, M., Bosco, P., Buono, S., Alberti, A., Failla, P., Peeters, H., Steyaert, J., Vissers, L., Francescato, L., Mefford, H.C., Rosenfeld, J.A., Bakken, T., O'Roak, B.J., Pawlus, M., Moon, R., Shendure, J., Amaral, D.G., Lein, E., Rankin, J., Romano, C., de Vries, B.B.A., Katsanis, N., Eichler, E.E., 2014. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* 158, 263-276.
- Betz, W.J., Mao, F., Smith, C.B., 1996. Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6, 365-371.
- Biagioli, M., Carino, A., Cipriani, S., Francisci, D., Marchiano, S., Scarpelli, P., Sorcini, D., Zampella, A., Fiorucci, S., 2017. The Bile Acid Receptor GPBAR1 Regulates the M1/M2 Phenotype of Intestinal Macrophages and Activation of GPBAR1 Rescues Mice from Murine Colitis. *J Immunol* 199, 718-733.

- Boesmans, W., Gomes, P., Janssens, J., Tack, J., Vanden Berghe, P., 2008. Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut* 57, 314-322.
- Caillaud, M., Le Drean, M.E., De-Guilhem-de-Lataillade, A., Le Berre-Scoul, C., Montnach, J., Nedellec, S., Loussouarn, G., Paille, V., Neunlist, M., Boudin, H., 2023. A functional network of highly pure enteric neurons in a dish. *Front Neurosci* 16, 1062253.
- Chi, P., Greengard, P., Ryan, T.A., 2001. Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nat Neurosci* 4, 1187-1193.
- Chi, P., Greengard, P., Ryan, T.A., 2003. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron* 38, 69-78.
- Coretti, L., Cristiano, C., Florio, E., Scala, G., Lama, A., Keller, S., Cuomo, M., Russo, R., Pero, R., Paciello, O., Mattace Raso, G., Meli, R., Cocozza, S., Calignano, A., Chiariotti, L., Lembo, F., 2017. Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Scientific reports* 7, 45356.
- De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazzanetti, D.I., Cristofori, F., Guerzoni, M.E., Gobetti, M., Francavilla, R., 2013. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS one* 8, e76993.
- de Vries, P., Soret, R., Suply, E., Heloury, Y., Neunlist, M., 2010. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G539-547.
- Dothel, G., Barbaro, M.R., Boudin, H., Vasina, V., Cremon, C., Gargano, L., Bellacosa, L., De Giorgio, R., Le Berre-Scoul, C., Aubert, P., Neunlist, M., De Ponti, F., Stanghellini, V., Barbara, G., 2015. Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 148, 1002-1011 e1004.
- Forsgard, R.A., Korpela, R., Stenman, L.K., Osterlund, P., Holma, R., 2014. Deoxycholic acid induced changes in electrophysiological parameters and macromolecular permeability in murine small intestine with and without functional enteric nervous system plexuses. *Neurogastroenterol Motil* 26, 1179-1187.
- Golubeva, A.V., Joyce, S.A., Moloney, G., Burokas, A., Sherwin, E., Arbolea, S., Flynn, I., Khochanskiy, D., Moya-Perez, A., Peterson, V., Rea, K., Murphy, K., Makarova, O., Buravkov, S., Hyland, N.P., Stanton, C., Clarke, G., Gahan, C.G.M., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2017. Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism. *EBioMedicine* 24, 166-178.
- Gonzales, J., Le Berre-Scoul, C., Dariel, A., Breheret, P., Neunlist, M., Boudin, H., 2020. Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity and is inversely associated with synapsin 1 expression in Hirschsprung disease. *Sci Rep* 10, 15119.
- Gonzales, J., Marchix, J., Aymeric, L., Le Berre-Scoul, C., Zoppi, J., Bordron, P., Burel, M., Davidovic, L., Richard, J.R., Gaman, A., Lejuste, F., Brouillet, J.Z., Le Vacon, F., Chaffron, S., Leboyer, M., Boudin, H., Neunlist, M., 2021. Fecal Supernatant from Adult with Autism Spectrum Disorder Alters Digestive Functions, Intestinal Epithelial Barrier, and Enteric Nervous System. *Microorganisms* 9.
- Gould, T.W., Swope, W.A., Heredia, D.J., Corrigan, R.D., Smith, T.K., 2019. Activity within specific enteric neurochemical subtypes is correlated with distinct patterns of gastrointestinal motility in the murine colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 317, G210-G221.
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., Benfenati, F., 1993. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780-785.
- Gu, Y.Y., Han, Y., Liang, J.J., Cui, Y.N., Zhang, B., Zhang, Y., Zhang, S.B., Qin, J., 2021. Sex-specific differences in the gut microbiota and fecal metabolites in an

- adolescent valproic acid-induced rat autism model. *Front Biosci (Landmark Ed)* 26, 1585-1598.
- Hosie, S., Ellis, M., Swaminathan, M., Ramalhosa, F., Seger, G.O., Balasuriya, G.K., Gillberg, C., Rastam, M., Churilov, L., McKeown, S.J., Yalcinkaya, N., Urvil, P., Savidge, T., Bell, C.A., Bodin, O., Wood, J., Franks, A.E., Bornstein, J.C., Hill-Yardin, E.L., 2019. Gastrointestinal dysfunction in patients and mice expressing the autism-associated R451C mutation in neuroligin-3. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 12, 1043-1056.
 - Jovanovic, J.N., Benfenati, F., Siow, Y.L., Sihra, T.S., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Greengard, P., Czernik, A.J., 1996. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3679-3683.
 - Kim, Y.S., Unno, T., Kim, B.Y., Park, M.S., 2020. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J Mens Health* 38, 48-60.
 - Kiriya, Y., Nochi, H., 2019. The Biosynthesis, Signaling, and Neurological Functions of Bile Acids. *Biomolecules* 9.
 - Lampe, J.W., Fredstrom, S.B., Slavin, J.L., Potter, J.D., 1993. Sex differences in colonic function: a randomised trial. *Gut* 34, 531-536.
 - Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M., Boudin, H., 2017. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol* 595, 583-598.
 - Leembruggen, A.J.L., Balasuriya, G.K., Zhang, J., Schokman, S., Swiderski, K., Bornstein, J.C., Nithianantharajah, J., Hill-Yardin, E.L., 2020. Colonic dilation and altered ex vivo gastrointestinal motility in the neuroligin-3 knockout mouse. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 13, 691-701.
 - Li, Z., Boesmans, W., Kazwiny, Y., Hao, M.M., Vanden Berghe, P., 2022. Simultaneous whole-cell patch-clamp and calcium imaging on myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 323, G341-G347.
 - Li, Z., Hao, M.M., Van den Haute, C., Baekelandt, V., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., 2019. Regional complexity in enteric neuron wiring reflects diversity of motility patterns in the mouse large intestine. *eLife* 8.
 - Liu, J., Liu, C., Gao, Z., Zhou, L., Gao, J., Luo, Y., Liu, T., Fan, X., 2022. GW4064 Alters Gut Microbiota Composition and Counteracts Autism-Associated Behaviors in BTBR T+tf/J Mice. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 911259.
 - Lonze, B.E., Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
 - Matsubara, M., Kusubata, M., Ishiguro, K., Uchida, T., Titani, K., & Taniguchi, H. (1996). Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 21108–21113. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21108>
 - Margiotta, J.F., Smith-Edwards, K.M., Nestor-Kalinoski, A., Davis, B.M., Albers, K.M., Howard, M.J., 2021. Synaptic Components, Function and Modulation Characterized by GCaMP6f Ca(2+) Imaging in Mouse Cholinergic Myenteric Ganglion Neurons. *Front Physiol* 12, 652714.
 - Margolis, K.G., Li, Z., Stevanovic, K., Saurman, V., Israelyan, N., Anderson, G.M., Snyder, I., Veenstra-VanderWeele, J., Blakely, R.D., Gershon, M.D., 2016. Serotonin transporter variant drives preventable gastrointestinal abnormalities in development and function. *The Journal of clinical investigation* 126, 2221-2235.
 - McElhanon, B.O., McCracken, C., Karpen, S., Sharp, W.G., 2014. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics* 133, 872-883.
 - Mertens, K.L., Kalsbeek, A., Soeters, M.R., Eggink, H.M., 2017. Bile Acid Signaling Pathways from the Enterohepatic Circulation to the Central Nervous System. *Front Neurosci* 11, 617.

- Monteiro-Cardoso, V.F., Corliano, M., Singaraja, R.R., 2021. Bile Acids: A Communication Channel in the Gut-Brain Axis. *Neuromolecular Med* 23, 99-117.
- Moore, A.N., Waxham, M.N., Dash, P.K., 1996. Neuronal activity increases the phosphorylation of the transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) in rat hippocampus and cortex. *J Biol Chem* 271, 14214-14220.
- Morton, J.T., Jin, D.M., Mills, R.H., Shao, Y., Rahman, G., McDonald, D., Zhu, Q., Balaban, M., Jiang, Y., Cantrell, K., Gonzalez, A., Carmel, J., Frankiensztajn, L.M., Martin-Brevet, S., Berding, K., Needham, B.D., Zurita, M.F., David, M., Averina, O.V., Kovtun, A.S., Noto, A., Mussap, M., Wang, M., Frank, D.N., Li, E., Zhou, W., Fanos, V., Danilenko, V.N., Wall, D.P., Cardenas, P., Baldeon, M.E., Jacquemont, S., Koren, O., Elliott, E., Xavier, R.J., Mazmanian, S.K., Knight, R., Gilbert, J.A., Donovan, S.M., Lawley, T.D., Carpenter, B., Bonneau, R., Taroncher-Oldenburg, G., 2023. Multi-level analysis of the gut-brain axis shows autism spectrum disorder-associated molecular and microbial profiles. *Nat Neurosci* 26, 1208-1217.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H.J., Dore, J., Blaut, M., 2006. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 72, 1027-1033.
- Phelps, T., Snyder, E., Rodriguez, E., Child, H., Harvey, P., 2019. The influence of biological sex and sex hormones on bile acid synthesis and cholesterol homeostasis. *Biol Sex Differ* 10, 52.
- Poole, D.P., Godfrey, C., Cattaruzza, F., Cottrell, G.S., Kirkland, J.G., Pelayo, J.C., Bunnnett, N.W., Corvera, C.U., 2010. Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 22, 814-825, e227-818.
- Quinn, M., McMillin, M., Galindo, C., Frampton, G., Pae, H.Y., DeMorrow, S., 2014. Bile acids permeabilize the blood brain barrier after bile duct ligation in rats via Rac1-dependent mechanisms. *Dig Liver Dis* 46, 527-534.
- Riccio, A., Alvania, R.S., Lonze, B.E., Ramanan, N., Kim, T., Huang, Y., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Ginty, D.D., 2006. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* 21, 283-294.
- Sasselli, V., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., Tissir, F., Goffinet, A.M., Pachnis, V., 2013. Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *The Journal of clinical investigation* 123, 1763-1772.
- Sharon, G., Cruz, N.J., Kang, D.W., Gandal, M.J., Wang, B., Kim, Y.M., Zink, E.M., Casey, C.P., Taylor, B.C., Lane, C.J., Bramer, L.M., Isern, N.G., Hoyt, D.W., Noecker, C., Sweredoski, M.J., Moradian, A., Borenstein, E., Jansson, J.K., Knight, R., Metz, T.O., Lois, C., Geschwind, D.H., Krajmalnik-Brown, R., Mazmanian, S.K., 2019. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell* 177, 1600-1618 e1617.
- Sun, Y., Fihn, B.M., Sjøvall, H., Jodal, M., 2004. Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut* 53, 362-367.
- Wang, L., Christophersen, C.T., Sorich, M.J., Gerber, J.P., Angley, M.T., Conlon, M.A., 2012. Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Digestive diseases and sciences* 57, 2096-2102.
- West, K.A., Yin, X., Rutherford, E.M., Wee, B., Choi, J., Chrisman, B.S., Dunlap, K.L., Hannibal, R.L., Hartono, W., Lin, M., Raack, E., Sabino, K., Wu, Y., Wall, D.P., David, M.M., Dabbagh, K., DeSantis, T.Z., Iwai, S., 2022. Multi-angle meta-analysis of the gut microbiome in Autism Spectrum Disorder: a step toward understanding patient subgroups. *Scientific reports* 12, 17034.
- Xiao, L., Yan, J., Yang, T., Zhu, J., Li, T., Wei, H., Chen, J., 2021. Fecal Microbiome Transplantation from Children with Autism Spectrum Disorder Modulates Tryptophan

and Serotonergic Synapse Metabolism and Induces Altered Behaviors in Germ-Free Mice. *mSystems* 6.

- Zeidan, J., Fombonne, E., Scolah, J., Ibrahim, A., Durkin, M.S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., Elsabbagh, M., 2022. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 15, 778-790.
- Zhang, M., Augustine, G.J., 2021. Synapsins and the Synaptic Vesicle Reserve Pool: Floats or Anchors? *Cells* 10.

FIGURES AND LEGENDS

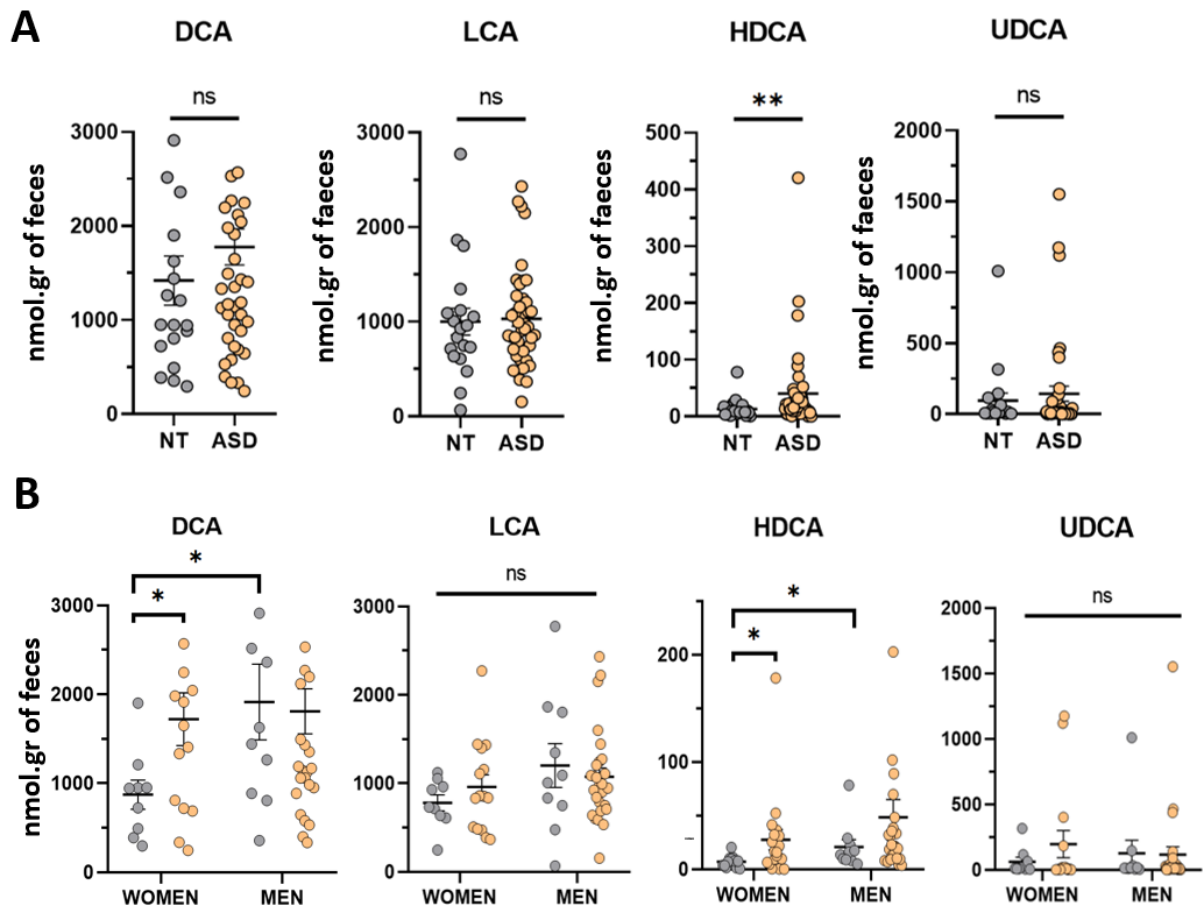


Figure 1: Differences in fecal content of DCA and HDCA between NT and ASD individuals are observed only in females. (A) Secondary bile acids (DCA, LCA, HDCA, and UDCA) were measured in fecal samples from adult individuals with autism spectrum disorder (ASD) or neurotypical (NT). **(B)** Stratification of secondary bile acids levels according to the biological sex of individuals. Data are mean \pm SEM. Each circle represents an individual. N= 19 NT individuals (9 women and 10 men) and 42 ASD individuals (15 women and 27 men). T-test or Mann-Whitney test was used based on data normality. Significance levels are denoted as “ns” (non-significant) for p-values > 0.05, * for p-values < 0.05, ** for p-values < 0.01, and *** for p-values < 0.001.

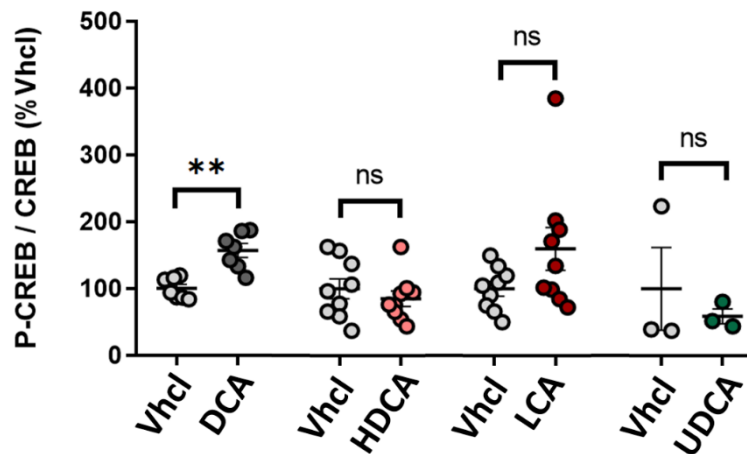


Figure 2: DCA induces an increase in CREB phosphorylation. Enteric neurons were treated with 1 μ M of DCA, HDCA, LCA, UDCA, or the vehicle (0.4% DMSO) for 5 minutes. Following treatment, cells were collected to measure the phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein (CREB) at Ser133 using western blot. DCA treatment resulted in a significant increase in CREB phosphorylation. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. Data are presented as mean \pm SEM. N=3 to 9 cultures from 3 independent experiments. Significance levels are denoted as “ns” (non-significant) for p-values > 0.05, * for p-values <0.05, ** for p-values <0.01, and *** for p-values <0.001.

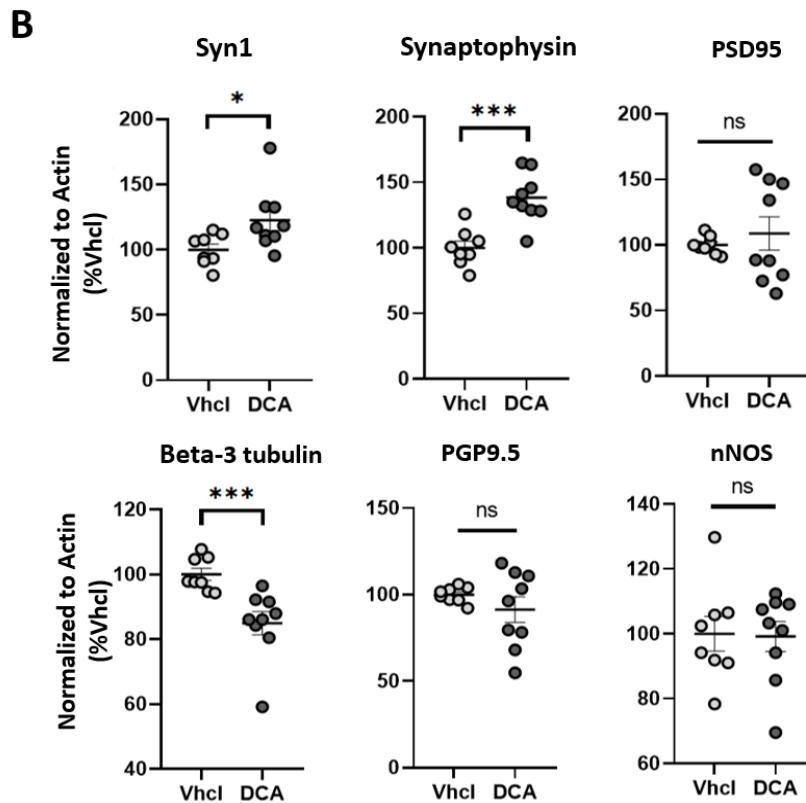
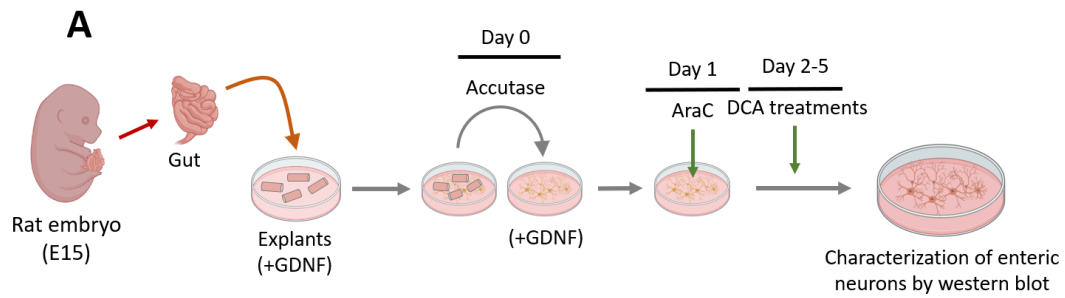


Figure 3: DCA modulates the expression of crucial synaptic proteins in enteric neurons. (A) A schematic representation indicating the process of culturing enteric neurons and the timeline for DCA treatments. Neurons were exposed to 1 μ M of DCA or the vehicle (0.4% DMSO) for 4 days before being collected for Western blot analysis. (B) DCA application increased expression of the presynaptic proteins synapsin 1 (Syn1) and synaptophysin but did not influence the postsynaptic protein PSD95. DCA reduced the expression of the axonal structural protein Beta-3-tubulin. Mann-Whitney test. Data are mean \pm SEM with N = 8 to 9 cultures from 3 independent experiments. Levels of significance are indicated as “ns” (non-significant) for p-values > 0.05, * for p-values < 0.05, ** for p-values < 0.01, and *** for p-values < 0.001.

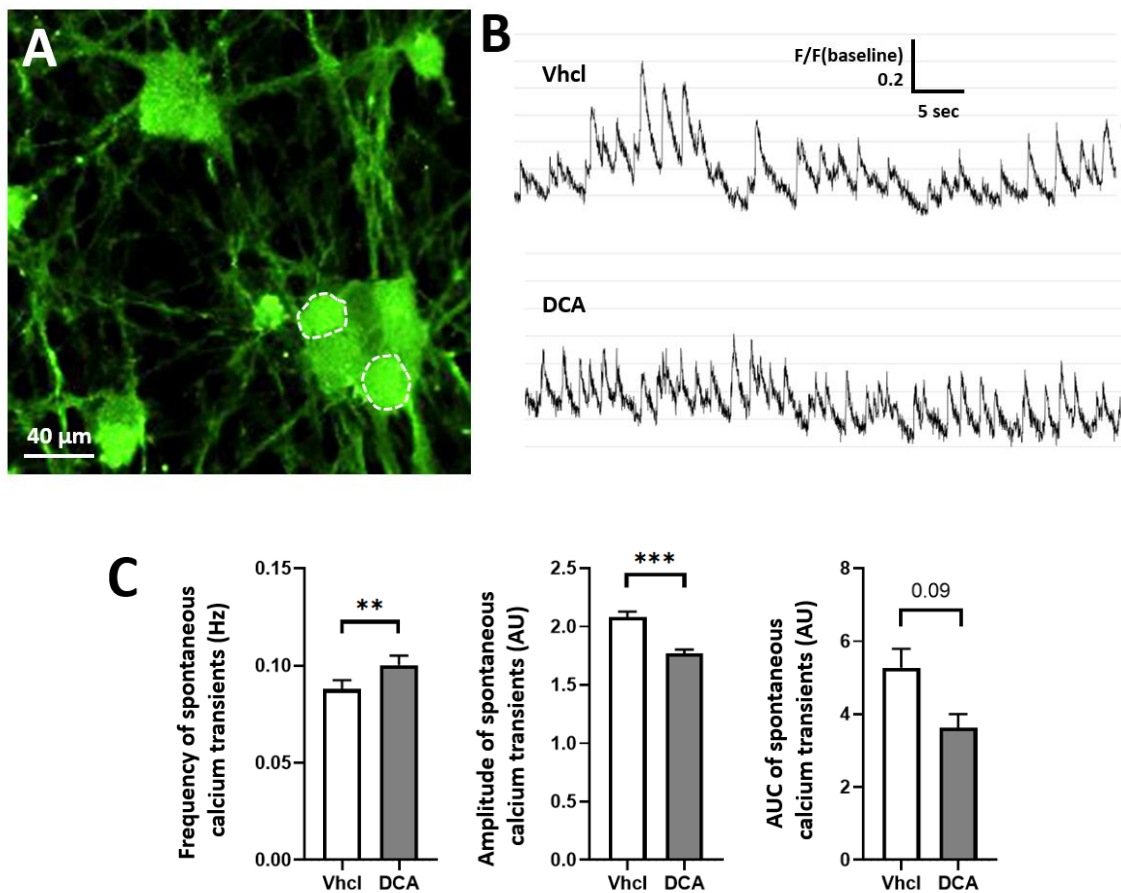
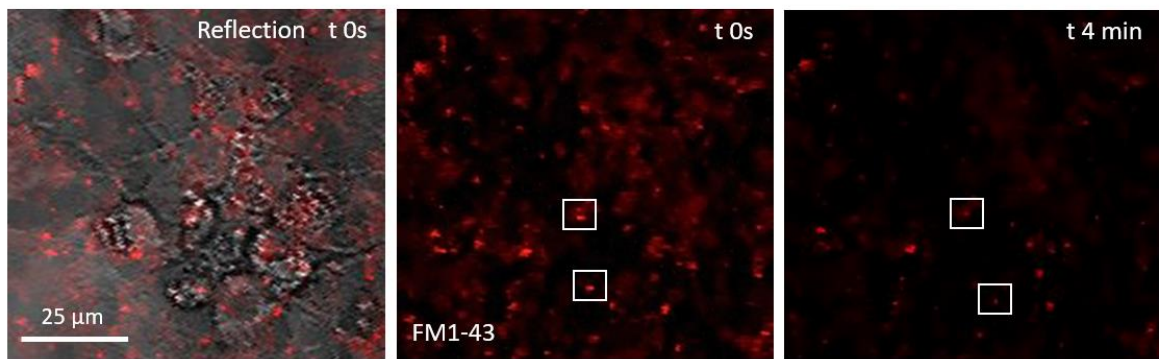
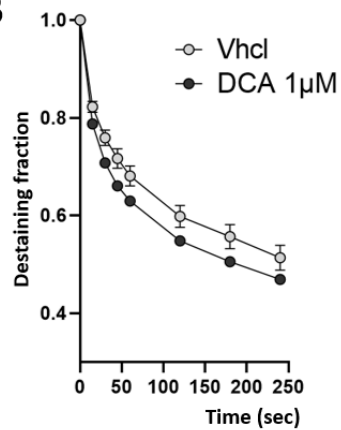


Figure 4: DCA modulates the spontaneous activity of enteric neurons. Spontaneous neuronal activity is assessed using live calcium imaging (Cal520). **(A)** Representative fluorescence microscopy image of enteric neurons. ROI (dotted circle) are neuronal cell bodies from which calcium transients are measured. **(B)** Traces illustrating changes in calcium signal intensity ($F/F(\text{baseline})$) representative of calcium transients in neurons treated with the vehicle (top) or DCA (bottom). **(C)** Quantification of the frequency, amplitude, and area under the curve (AUC) of spontaneous calcium transients. Mann-Whitney test. Data are mean \pm SEM with $n=208$ (vhl) and 264 (DCA) neurons from two independent cultures. Levels of significance are indicated as “ns” (non-significant) for p -values > 0.05 , * for p -values < 0.05 , ** for p -values < 0.01 , and *** for p -values < 0.001 .

A



B



C

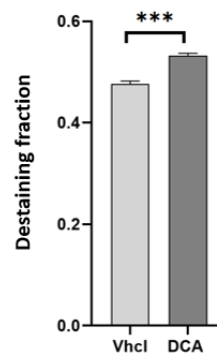


Figure 5: DCA increases synaptic vesicle exocytosis in enteric neurons. (A) Representative images of enteric neurons labeled with FM1-43 at t0 and t 4 min. A merged picture of fluorescence and reflection microscopy is shown at t0 on the left, the synaptic clusters are labeled by the FM1-43 dye and are visible as red clusters. After 4 min post-stimulation, the synaptic vesicles have been exocytosed and fluorescence intensity in clusters is reduced. (B) Illustrative graph of FM1-43 fluorescence decline (represented as destaining fraction) induced by a 1 min exposure of 90 mM KCl. Destaining fraction is calculated using the formula: $1 - (\text{Fluo at 4min} / \text{Fluo at 0s})$. (C) Destaining fraction after 4 min post KCl stimulation. Mann-Whitney test. Data are mean \pm SEM with n=655 clusters (vhcl) and 1055 clusters (DCA) from 6 independent cultures and 3 independent experiments. Levels of significance are indicated as “ns” (non-significant) for p-values > 0.05 , * for p-values < 0.05 , ** for p-values < 0.01 , and *** for p-values < 0.001 .

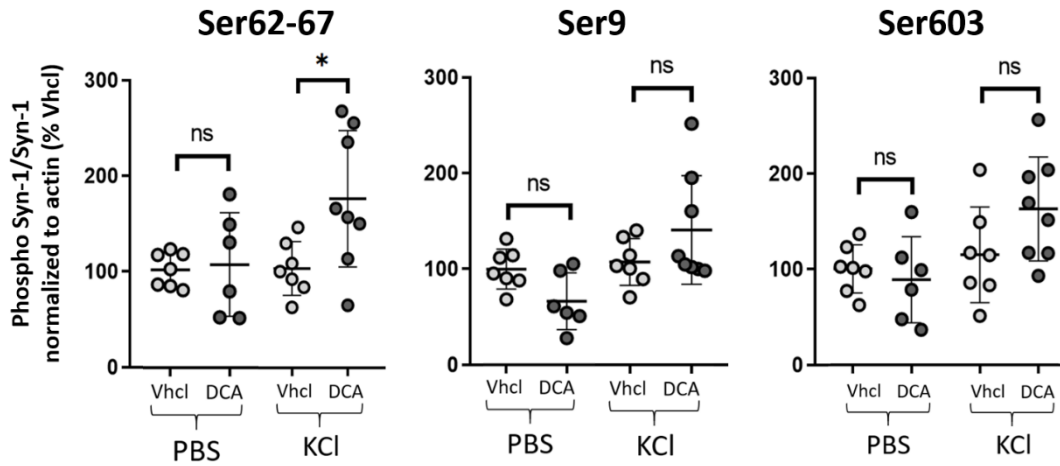


Figure 6: Enteric neurons chronically exposed to DCA displayed an increase in synapsin 1 (Syn-1) phosphorylation at site Ser 62-67 upon 1 min KCl stimulation. Enteric neurons pretreated with DCA (DCA) or the vehicle (vhcl) were stimulated for 1 min with 90 mM KCl or PBS (control) and collected for Syn-1 phosphorylation analysis using western blot. Mann-Whitney test. Data are mean \pm SEM with $n= 7$ to 8 cultures from 3 independent experiments. Levels of significance are indicated as “ns” (non-significant) for p -values > 0.05 , * for p -values <0.05 , ** for p -values <0.01 , and *** for p -values <0.001 .

Résultats Supplémentaires

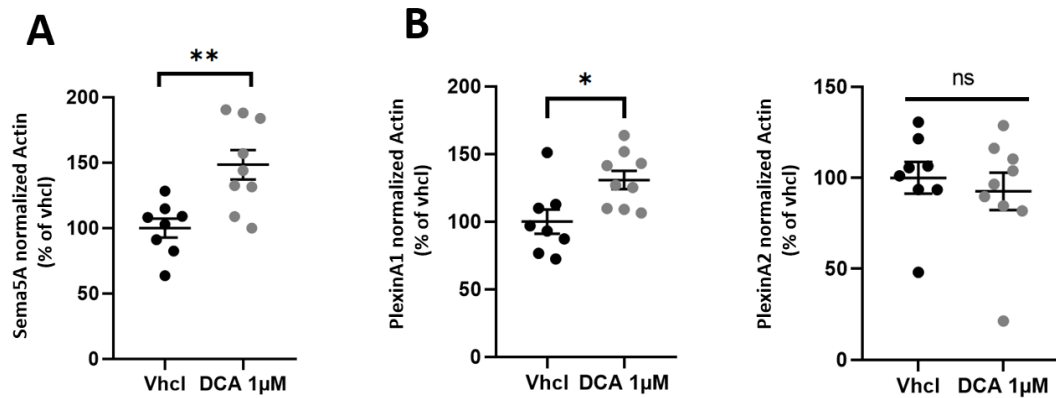


Figure S1 : L'exposition chronique au DCA, augmenté dans l'autisme, modifie l'expression protéique de la Sémaphorine 5A (Sema5A) et de son récepteur Plexin A1 dans les neurones entériques. Des cultures primaires de neurones entériques purifiées ont été traitées de manière chronique avec 1 µM de DCA ou le véhicule (Vhcl DMSO 0.4%), puis récupérées pour analyse protéique par western blot. **(A)** L'exposition au DCA augmente significativement l'expression protéique de la protéine de guidage axonale associée à l'autisme Sema5A, ainsi que l'un de ses récepteurs Plexin A1 mais n'impacte pas l'expression du récepteur Plexin A2 **(B)**. Données représentées en moyenne ± SEM (n=8 puits de cultures obtenus à partir de 3 cultures indépendantes). Mann-Whitney test *p<0.05, ** p<0.01

Ces résultats supplémentaires s'inscrivent dans l'exploration des interactions potentielles entre les facteurs génétiques et environnementaux de l'autisme dans le SNE. Ici, nous montrons que l'exposition chronique au DCA, augmenté dans l'autisme, modifie l'expression protéique de la Sema5A et de son récepteur Plexin A1 dans les neurones entériques. Bien que cette étude représente une première étape expérimentale qui nécessite une exploration plus approfondie, elle met en évidence l'interaction entre un facteur génétique et environnemental pertinent de l'autisme au sein des neurones entériques.

Discussion

Mes travaux de thèse s'intègrent dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les troubles GI associés aux TSA. Dans cette optique, nous nous sommes concentrés sur le SNE, un acteur essentiel de la physiologie digestive, et tout à la fois impliqué dans l'axe intestin-cerveau. Notre étude s'est focalisée sur les mécanismes moléculaires de la connectivité neuronale du SNE dans le contexte de l'autisme, en intégrant l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, en particulier le microbiote intestinal.

En effet, bien que le développement et l'activité du SNE soient essentiels aux fonctions digestives, ils demeurent encore trop largement méconnus dans le contexte de l'autisme. Il est crucial d'approfondir notre compréhension des dysfonctionnements entéro-neuronaux au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau, pour mieux cerner la nature et l'origine des troubles GI associés aux TSA.

Dans ce contexte général, mon travail de thèse s'est organisé en deux parties. L'une plus fondamentale vise à caractériser le rôle de la sémaphorine 5A (Sema5A) et l'une de ses mutations retrouvées dans l'autisme, dans le développement, la connectivité neuronale et le fonctionnement du SNE. L'autre plus translationnelle vise à caractériser l'impact de métabolites du microbiote intestinal, altérés dans l'autisme sur le fonctionnement du SNE.

La sémaphorine 5A : un acteur moléculaire de la connectivité du SNE

La Sema5A est une molécule de guidage axonale, caractérisée dans le SNC ainsi que dans une partie du SN périphérique comme jouant un rôle bifonctionnel (permissif ou répulsif en fonction du contexte) dans la mise en place des réseaux axonaux et dans la synaptogénèse (Kantor et al., 2004 ; Duan et al., 2014 ; Matsuoka et al., 2011 ; Masuda et al., 2014). **Cependant, son rôle dans le SNE n'a jamais été caractérisé.**

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une expression de la molécule Sema5A et de ses récepteurs Plexin A1 et A2 (Pasterkamp, 2012) au niveau des neurones entériques, dans le plexus myentérique de rat. D'un point de vue structurel, nous avons mis en évidence que la Sema5A avait un effet facilitateur sur le réseau axonal entérique avec une augmentation de la complexité axonale associée à une augmentation du nombre de synapses comme l'illustre l'augmentation du nombre de clusters de la protéine pré-synaptique synapsine 1. D'un point de vue fonctionnel, la Sema5A impacte l'activité synaptique des neurones entériques en exerçant un contrôle bidirectionnel de la phosphorylation de synapsine 1 en fonction de la dépolarisation neuronale et réduit l'exocytose des

vésicules synaptiques. De manière intéressante, ces effets induits par la Sema5A sont abolis par la mutation S956G associée à l'autisme.

Ainsi, cette étude montre pour la première fois le rôle de la protéine associée à l'autisme, Sema5A, sur la connectivité du SNE. Cependant, nous ne connaissons pas le rôle fonctionnel de la Sema5A sur la physiologie digestive dans un contexte plus intégré. Dans le cadre des révisions de l'article actuellement soumis dans iScience (en révision favorable), nous avons entrepris de répondre à cette question en étudiant l'impact de la Sema5A dans des conditions *ex vivo* sur la motricité intestinale régulée par le SNE. Pour ce faire, la motricité intestinale *ex vivo* de segments de colon distal de rat, préalablement incubés pendant 30 min avec la protéine Sema5A à 30 nM ou le fragment Fc (contrôle), est évaluée en chambre d'organe isolé. Dans cette expérience, le segment d'intestin est stimulé électriquement par EFS (*Electrical Field Stimulation*), un protocole connu pour stimuler spécifiquement le SNE de manière à induire une réponse neuromusculaire du segment intestinal (Montgomery et al., 2015). Ce protocole sera appliqué avec ou sans antagonistes neurochimiques, permettant ainsi de dresser un profil fonctionnel du SNE au sein de notre échantillon colique.

Ces résultats, encore trop préliminaires pour en discuter ici, nous permettront d'étudier l'impact possible de la Sema5A sur le SNE dans un modèle *ex-vivo* plus intégré et nous permettront, dans un second temps, d'explorer les mécanismes des effets induits par la Sema5A en recherchant l'identité du récepteur impliqué. Les mêmes expériences seront alors réalisées en présence d'anticorps bloquants des récepteurs Plexin A1 ou A2 ce qui permettra de déterminer si ces récepteurs sont impliqués dans la réponse du SNE à la Sema5A.

Ces résultats viennent renforcer le champ restreint mais grandissant de la recherche s'intéressant au rôle des molécules impliquées dans l'autisme sur le SNE (Hosie et al., 2019 ; Robinson et al., 2023 ; Margolis et al., 2016; Bernier et al., 2014 ; ces études sont décrites en détails lors du chapitre 2, page 70-72). Notre étude montre également que des mutations associées à l'autisme impactent le rôle de ces molécules dans le SNE, avec des conséquences fonctionnelles, qui pourraient contribuer aux troubles GI associés à la physiopathologie de l'autisme.

La Sema5A dans l'autisme

La Sema5A est une protéine codée par le gène *SEMA5A*. Ce gène est considéré comme un gène de susceptibilité à l'autisme et des rares variants l'affectant ont été retrouvés chez des individus avec TSA (Kim et al., 2017 ; Mosca-Boidron et al., 2016 ; Weiss et al., 2009 ; Cheng et al., 2013). Additionnellement, *SEMA5A* a été retrouvée down-régulée chez des individus avec TSA (Melin et al., 2006). Dans notre étude, nous montrons que la mutation S956G observée chez un garçon avec autisme (Mosca-Boidron et al., 2016) abolit complètement les effets de la Sema5A sur la connectivité des neurones entériques, pouvant alors entraîner des conséquences sur la physiologie digestive.

A ce jour, aucune étude décrivant des mutations du gène *SEMA5A*, dont celle de Mosca-Boidron et collaborateurs, ne s'est intéressée au phénotype GI des patients. Il est important de noter que les variants chez *SEMA5A* donnent lieu à des phénotypes sévères, avec une large majorité de déficiences intellectuelles et de retards développementaux globaux associés à de l'autisme. De ce fait, les troubles GI peuvent passer tout à fait inaperçus face à la sévérité de ces symptômes principaux.

Néanmoins, une étude approfondie des descriptions cliniques des patients porteurs d'une mutation sur *SEMA5A*, répertoriée sur la base de données DECIPHER (DECIPHER Firth et al., 2009), nous permet d'identifier quelques patients avec des descriptions cliniques telles que des difficultés d'alimentation durant l'enfance, des reflux gastro-œsophagiens et de la constipation. De plus, la délétion de *SEMA5A* est fréquemment retrouvée dans le syndrome du cri-du-chat, un syndrome génétique causé par la délétion d'une partie plus ou moins grande du bras court du chromosome 5, où est localisée *SEMA5A* (Chen et al., 2013 ; Zhang et al., 2016), et associé à de graves retards développementaux avec une constipation sévère observée chez certains patients (Ouldim et al., 2012).

De façon intéressante, des modèles souris invalidées pour le gène *Sema5A* existent et présentent une altération des interactions sociales, réminiscences de l'autisme (Duan et al., 2014). **Cependant, les fonctions digestives et le SNE de ces modèles n'ont jamais été caractérisés.** Néanmoins, une étude de Gunn et collaborateurs, rapportent une augmentation de la défécation chez les souris exprimant une forme tronquée de la *Sema5A* comparées au contrôle (Gunn et al., 2011, *Supplementary material*). Cette observation laisse penser que d'éventuelles altérations du transit, et de l'activité du SNE, existent chez les souris déficientes pour *Sema5A*.

Impact du microbiote intestinal sur la *sema5A* :

Lors de ce travail de thèse, je me suis intéressée à un facteur génétique, *SEMA5A* et un facteur environnemental, le microbiote intestinal. Cependant, l'un n'évolue pas indépendamment de l'autre. En effet, de nombreuses études montrent l'impact de la génétique de l'hôte sur la composition du microbiote intestinal (Rogel-Gaillard et al., 2023 ; Goodrich et al., 2015) et notamment dans l'autisme avec des modèles génétiques des TSA présentant des différences dans la composition de leur microbiote intestinal (ex : souris BTBR) (Coretti et al., 2017; Golubeva et al., 2017). L'inverse est vrai puisque le microbiote intestinal est capable d'influencer l'épigénétique et l'expression génique de l'hôte (ex : Le butyrate comme inhibiteur des HDAC) (Cleophas et al., 2016 ; Gonzales et al., 2021 ; Tremaroli & Bäckhed, 2012). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'action du DCA, retrouvé augmenté dans l'autisme, sur l'expression de la *Sema5A* et ses récepteurs dans un modèle de culture primaire de neurones entériques (Résultats supplémentaires Figure S1 page 185). J'ai ainsi mis en évidence une augmentation de l'expression de la *Sema5A* et de son récepteur Plexin A1 mais pas de Plexin A2, chez les neurones entériques exposés de manière chronique au DCA.

Bien que constituant une première approche expérimentale qui mériterait une plus ample investigation, ces résultats rappellent que génétique et environnement se côtoient et, dans le contexte de l'autisme, des molécules de l'hôte associées aux TSA, ne sont pas imperméables à l'influence du microbiote intestinal. Cela pourrait constituer un vaste champ de mécanismes au travers desquels le microbiote intestinal peut contribuer et/ou entretenir les troubles GI dans les TSA.

Etude du microbiote intestinal dans l'autisme

Lors de ma thèse, j'ai pu participer à une étude portée par Dr. Justine Marchix, s'intéressant à l'impact du transfert de microbiote fécal provenant d'individus adultes avec TSA sur le comportement et les fonctions digestives des souris receveuses. Cette étude, toujours en cours, n'est pas présentée dans ce manuscrit mais un abstract, que j'ai eu l'opportunité de présenter au congrès ESNM 2023, est disponible en annexe page 197.

Cette étude utilise une cohorte d'individus avec TSA, femmes et hommes, avec ou sans troubles GI, sans déficience intellectuelle (individus à haut potentiel, type Asperger) et sans prise d'antibiotique ou de médication 8 semaines avant la collection des échantillons fécaux. Une cohorte d'individus contrôles neurotypiques, femmes et hommes sans troubles GI est également incluse.

Durant cette étude, j'ai participé à la mise en place et à la caractérisation comportementale des souris receveuses, utilisant une batterie de tests comportementaux pertinents des TSA. Je me suis aussi intéressée à un potentiel remodelage du SNE dans les tissus intestinaux de ces souris (analyse biochimique par WB de protéines neuronales dans le colon proximal et distal des souris, non présentée dans ce manuscrit).

L'action du microbiote intestinal sur l'hôte peut impliquer des composants des parois des bactéries (peptidoglycannes, LPS) ou des métabolites produits par le métabolisme des bactéries. De grandes familles de métabolites bactériens sont connues et étudiées pour leur implication dans les fonctions digestives comme les AGCC ou les sels biliaires capables de moduler la perméabilité et la motricité intestinale (Alemi et al., 2013, Sun et al., 2004, Soret et al., 2010). Face à l'importance fonctionnelle de ces composés, des dosages de différents métabolites bactériens ont été réalisés sur les échantillons de selles de la cohorte des individus TSA et contrôle. Les acides biliaires primaires et secondaires, provenant alors du métabolisme des acides biliaires primaires par les bactéries du MI ont également été dosés.

Le rôle du DCA sur la connectivité et le fonctionnement du SNE

Les résultats, présentés dans l'article 2, montrent une augmentation spécifique des acides biliaires DCA et HDCA, uniquement chez les femmes avec autisme. L'augmentation du DCA fécal observée ici vient renforcer les observations de Gonzales et collaborateurs, indiquant une forte tendance dans l'augmentation du DCA fécal chez les individus avec TSA comparé aux contrôles neurotypiques (p-value 0.056) (Gonzales et al., 2021). Pour la première fois, notre étude montre l'augmentation dans l'autisme d'un autre acide biliaire secondaire, l'acide hydoxycholeique (HDCA).

Dans cet article n°2, nous avons décidé de nous concentrer sur le DCA uniquement. Ce choix a été motivé par les premières expériences préliminaires portant sur l'identification d'une voie signalétique activée dans les neurones entériques sous l'action des acides biliaires. Les neurones entériques exprimant le récepteur aux acides biliaires TGR5 (Poole et al., 2010), nous avons étudié la voie signalétique CREB, celle-ci ayant été décrite dans d'autres modèles comme étant activée par les acides biliaires via le récepteur TGR5. Nous avons observé que le DCA était le seul parmi les autres acides biliaires secondaires étudiés (LCA, UDCA et HDCA) à induire une activation de CREB dans notre modèle de culture primaire de neurones entériques de rat. Additionnellement, le DCA bénéficie d'une littérature naissante mais robuste sur son potentiel rôle dans l'autisme, porté par les articles de Gonzales et al., 2021 et Golubeva et al 2017. Pour rappel, Golubeva et collaborateurs ont montré une modification du métabolisme des acides biliaires secondaires dont le LCA et le DCA chez les souris BTBR, modèle d'autisme idiopathique.

Concernant l'HDCA, aucune étude ne le relie actuellement à l'autisme et son rôle dans les fonctions digestives souffre d'un grand manque de littérature scientifique. Un article de 2020 par Song et collaborateurs indique qu'une supplémentation à de fortes doses d'HDCA inhibe la prolifération des cellules épithéliales intestinales, agissant de manière directe sur le récepteur aux acides biliaires FXR ce qui pourrait alors impacter les fonctions digestives (Song et al., 2020). D'autres articles indiquent des effets protecteurs de l'HDCA sur l'organisme par une action sur la régulation du cholestérol (Shen et al., 2023), ainsi qu'un effet protecteur contre la colite dans un modèle murin de colite induite par le DSS (Dextran Sulfate Sodium) (Watnabe et al., 2022). L'HDCA semble également présenter une action anti-inflammatoire sur la microglie du cerveau dans un modèle d'inflammation au LPS chez la souris (Zhu et al., 2022). L'ensemble de ces données très récentes souligne les actions complexes et multiples de l'HDCA dont les implications sur la physiologie de l'hôte restent encore à déterminer. L'HDCA n'est cependant pas négligé dans nos recherches ; l'étude de son impact sur le SNE a été amorcée au laboratoire et des études futures pourraient explorer davantage son implication dans l'autisme.

Les résultats de l'article n°2 indiquent que l'exposition chronique des neurones entériques au DCA induit un remodelage du réseau neuronal, caractérisé par une diminution de l'expression de la protéine Beta-3 tubulin, une protéine du cytosquelette et du réseau axonal, accompagnée d'une

augmentation de l'expression des protéines pré-synaptiques synapsin 1 et synaptophysine. Au niveau synaptique, le DCA induit une augmentation de l'exocytose des vésicules synaptiques après stimulation au KCl. Cette augmentation de l'exocytose est associée à une augmentation de la phosphorylation de la synapsin 1, un mécanisme pivot dans la libération des vésicules en pré-synaptique. Également, les neurones exposés au DCA présentent une augmentation de leur activité calcique spontanée, avec une augmentation de la fréquence des transitoires calciques associée à une diminution de leur amplitude. Les mécanismes moléculaires et la nature neurochimique de ces altérations fonctionnelles du SNE par le DCA restent encore à déterminer. Néanmoins, cette augmentation de l'activité neuronale pourrait aller dans le sens des effets déjà montrés du DCA sur ses capacités à accélérer le transit intestinal (Kim et al., 2017 ; Shiff et al., 1982).

Afin de mieux caractériser l'implication du DCA dans les troubles digestifs observés dans l'autisme, un traitement chronique chez des souris avec cet acide biliaire secondaire à des concentrations similaires à celles observées dans les échantillons fécaux des femmes avec TSA permettrait de mieux comprendre sa potentielle implication dans les troubles digestifs. Ces expériences *in vivo* pourront être mises en place dans les mois prochains (*je me dois de préciser ici que je bénéficie d'un prolongement de mon contrat de plusieurs mois me permettant de rester investie dans cette prochaine étape de l'étude*) et permettront également de prendre en compte l'influence du sexe sur les effets du DCA avec l'utilisation de souris mâles ou femelles.

En effet, sur ce point réside une faiblesse de notre étude, puisque nous n'avons pas pris en compte le sexe des embryons à partir desquels les cultures primaires de neurones entériques ont été réalisées. Ce paramètre est identifiable par génotypage des embryons pour le gène SRY associé au chromosome Y (Su & Loch-Carusio, 2020), une méthode robuste mais très chronophage.

Le DCA comme acteur de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les TSA

Les prochaines expériences programmées *in vivo* pourront permettre d'étudier l'impact du DCA au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau. En effet, le microbiote dans l'autisme est capable d'influencer le comportement, et des approches thérapeutiques ciblant ce dernier permettent des améliorations des symptômes GI et comportementaux des TSA (Kang et al., 2017, 2019). Les médiateurs de ces effets restent néanmoins largement incompris. Dans notre étude, nous étudierons si le DCA, retrouvé augmenté dans les TSA, peut être un médiateur pertinent dans l'autisme et contribuer aux troubles comportementaux caractéristiques des TSA.

Le DCA, comme la majorité des acides biliaires, possède des propriétés hydrophobes, ce qui permettrait à une portion d'entre eux, massivement réabsorbés dans la circulation systémique au niveau du tractus digestif, de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) par diffusion passive et

d'atteindre le cerveau (Xing et al., 2023). En effet, le DCA ainsi que d'autres acides biliaires ont été retrouvés et dosés dans le cerveau de rat, souris et d'humain. Le DCA a ainsi été mesuré à une concentration de $0,37 \pm 0.11$ nmol.g de tissus cérébral chez l'humain (Pan et al., 2017), $0,064 \pm 0.052$ nmol.g chez le rat (Mano et al., 2004) et de $0,05 \pm 0.003$ nmol.g chez la souris (Pan et al., 2017). De plus, les niveaux de CA, CDCA et DCA cérébraux sont positivement corrélés avec les niveaux retrouvés dans la circulation systémique. Enfin, le CA et le CDCA marqués au deutérium et injectés par voie intrapéritonéale sont détectés dans le cerveau du rat, argument en faveur de la capacité de ces derniers à traverser la BHE (Higashi et al., 2017)

Par ailleurs, les récepteurs FXR et TGR5 sont exprimés par les neurones centraux, chez l'humain et la souris (Keitel et al., 2010 ; McMillin et al., 2016 ; Huang et al., 2016) et les souris KO pour le récepteur FXR présentent des altérations mnésiques et motrices (Huang et al., 2015). Des altérations comportementales sont également observées chez les souris invalidées pour le récepteur TGR5 avec une augmentation de l'anxiété et de la dépression chez ces animaux (Tao et al., 2023). Cela laisse penser que les acides biliaires pourraient présenter un rôle dans les fonctions cérébrales et notamment cognitives.

Ainsi, le DCA en concentration augmentée pourrait impacter les fonctions cérébrales et contribuer aux troubles comportementaux dans l'autisme. L'utilisation de modèle *in vivo* supplémenté de manière chronique au DCA permettrait d'explorer l'impact du DCA de manière intégrée, au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau, et d'étudier, non seulement son impact sur le SNE au sein du tractus digestif, mais aussi son impact sur le comportement des animaux.

Conclusion

Ce travail de thèse fut consacré à contribuer à une meilleure compréhension de l'origine des troubles gastro-intestinaux dans l'autisme en visant le fonctionnement du SNE sous différents facteurs, génétiques ou environnementaux, associés à l'autisme.

Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence l'implication de la protéine associée à l'autisme, sémaphorine 5A, dans la connectivité et le fonctionnement du SNE. Nous avons aussi montré qu'une forme mutée, retrouvée dans les TSA, de cette protéine Sema5A, abolit ses effets sur le SNE. Ces résultats étayent le champ grandissant de la recherche s'intéressant au rôle de molécules affectées dans l'autisme sur le SNE et la physiologie digestive. Un champ crucial pour établir de robustes connaissances sur la physiopathologie de l'autisme.

Enfin, j'ai centré une partie de mon travail de thèse sur un facteur environnemental grandissant dans l'autisme, qui est le microbiote intestinal. En plus d'avoir eu l'opportunité de participer à une étude de transfert de microbiote fécal provenant d'individus avec autisme chez la souris, nous avons montré que le métabolite microbien, qu'est l'acide biliaire secondaire DCA est augmenté dans les fèces des femmes avec TSA comparées aux femmes neurotypiques. Nous avons également montré que l'exposition chronique au DCA chez les neurones entériques induit un remodelage du réseau axonal et synaptique, associé à des modifications fonctionnelles sur l'activité synaptique et calciques de ces neurones. Ces résultats, qui seront complétés par une approche *in vivo*, montrent l'impact du DCA sur le fonctionnement du SNE avec de potentielles conséquences sur les fonctions digestives.

Cette thèse contribue à approfondir notre compréhension des troubles gastro-intestinaux associés à l'autisme. Il est essentiel d'affiner la caractérisation du SNE dans le contexte des TSA, en le considérant comme un organe pleinement intégré à l'axe microbiote-intestin-cerveau. Il est alors primordial de tenir compte à la fois des facteurs génétiques de l'individu et des éléments environnementaux clés, tels que le microbiote intestinal. Cette recherche est essentielle pour identifier et développer des cibles thérapeutiques au sein de cet axe, dans le but d'atténuer efficacement les troubles gastro-intestinaux des personnes atteintes de TSA.

Annexes

Abstract de l'étude de transfert de microbiote fécal d'individus TSA adultes chez la souris. Etude que j'ai pu présenter (oral) au congrès Européen ESNM NeuroGastro 2023 à Bucarest - Roumanie

ABSTRACTS

Neurogastroenterology & Motility | NGM | WILEY

149 of 150

Abstract Code: NGS18313-88 | Fecal microbiota from adult with autism spectrum disorder alters brain and digestive functions in recipient mice

J. Marchix¹; M. Le Dréan¹; T. Oullier¹; P. Aubert¹; J. Z. Brouillet²; J. Doré³; L. Davidovic⁴; M. Leboyer²; H. Boudin¹; M. Neunlist¹
¹Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders, IMAD, Université de Nantes, Nantes, France; ²INSERM U955 Neuro-Psychiatrie Translationnelle, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France; ³Université Paris-Saclay, INRAE, Agro Paris Tech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France; ⁴Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France

Background: Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders defined by impaired social communication and interactions as well as repetitive and stereotyped behaviors. Gastrointestinal (GI) disorders appear as high prevalent comorbidities of ASD and correlate with behavioral symptom severity. Also, changes of the gut bacteria are described in children with ASD. However, alterations of the microbiota-gut-brain axis in adult with ASD remains poorly investigated. Therefore, we evaluated the role of gut microbiota of individuals with ASD with or without GI disorders (ASD Gi- or ASD Gi+) on gut and brain functions. **Methods:** Adult C57/Bl6 mice received the fecal microbiota of Control or ASD (ASD Gi- or ASD Gi+) donors. Four weeks following fecal microbiota transplantation (FMT), behavior and digestive functions were evaluated. Fecal microbiome and metabolomic profiles of recipient mice were analyzed. **Results:** Shotgun analysis of the fecal murine microbiota allows to identify human bacteria up to five weeks following transplantation. Changes in microbiome was associated with an altered metabolomic profile, including short chain fatty acids. Mice colonized with adult ASD microbiota did not showed major alterations of their social interactions, however, changes in anxiety were observed. We showed that FMT of ASD Gi- or ASD Gi+ individuals altered digestive functions of the murine recipient. Specifically, the mice colonized with ASD Gi+ microbiota display an altered transit compared to Control microbiota. FMT of ASD Gi- and Gi+ individuals also induced a region-specific decrease in paracellular permeability compared to mice transplanted with the microbiota of control individuals. **Conclusion:** Altogether, these data support a role for the gut microbiota in the gut-brain axis in ASD and call for further investigation in neurodevelopmental disorders in human adulthood.

Keywords: autism; intestinal permeability; gut microbiota; gastrointestinal disorders

Abstract Code: NGS18314-89 | Curricular representation of neurogastroenterology: A survey among medical students in Germany

R. Patejdl¹; P. Neckel²
¹Health and Medical University Erfurt, Germany; ²University of Tübingen, Germany

Neurogastroenterological disorders (NGDs) are highly prevalent and substantially impact patients' quality of life. Effective treatment of NGDs depends on the competence and training of medical caregivers. Students' perceived competence in neurogastroenterology and its place in medical school curricula are assessed in this study.

A multi-center digital survey among medical students was conducted at five universities. Self-ratings of competence regarding basic mechanisms, diagnosis, and treatment of six chronic medical conditions were assessed. These included irritable bowel syndrome (IBS), gastroesophageal reflux disease, and achalasia. Ulcerative colitis, hypertension, and migraine were included as references.

Of 231 participants, 38% remembered that neurogastroenterology was covered in their curriculum. Highest competence ratings were stated for hypertension and lowest for IBS. These findings were identical for all institutions irrespective of their curricular model and demographic parameters. Students who remembered neurogastroenterology as a part of their curriculum reported higher competence ratings. According to 72% of students, NGDs should be highlighted more prominently in the curriculum.

Despite its epidemiological relevance, neurogastroenterology is only weakly represented in medical curricula. Students report low levels of subjective competence in handling NGDs. In general, assessing the learners' perspective on an empirical basis may enrich the process of national standardization of medical school curricula.

Abstract Code: NGS18315-90 | A role for Gpr37 in inflammation-induced dysmotility in the enteric nervous system

K. Robertson¹; O. Hahn²; A. Faruk³; R. Hall⁴; T. Wyss-Coray²; L. Becker⁵; J. Kaltschmidt¹
¹Department of Neurosurgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA; ²Department of Neurology and Neurological Sciences, Stanford School of Medicine, Stanford, California, USA; ³Department of Human Biology, Stanford University, Stanford, California, USA; ⁴Department of Pharmacology and Chemical Biology, Emory University, Atlanta, Georgia, USA; ⁵Department of Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA

Courte revue sur le microbiote intestinal et ses implications sur la santé. Publiée dans *Hépatogastro&Oncologie Digestive* en 2021

**HEPATO-GASTRO
& ONCOLOGIE
DIGESTIVE**

ÉDITORIAL

Seven minutes to understand the gut microbiota and its impact on health

Morgane E. Le Dréan
Justine Marchix
Michel Neunlist
Hélène Boudin

Université de Nantes, Inserm UMR 1235, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders, IMAD, Nantes

Correspondance : M. Le Dréan
Morgane.Ledrean@univ-nantes.fr

Copyright : John Libbey Eurotext, 2021
doi : 10.1684/hpg.2021.2172

Pour citer cet article : Le Dréan ME, Marchix J, Neunlist M, Boudin H. Sept minutes pour comprendre le microbiote intestinal et son impact sur la santé. *Hépatogastro et Oncologie Digestive* 2021 ; 28 : 555-560. doi : 10.1684/hpg.2021.2172

Sept minutes pour comprendre le microbiote intestinal et son impact sur la santé

Qu'est-ce qu'un microbiote intestinal ?

Le microbiote regroupe tous les micro-organismes présents et cohabitant dans un environnement donné. Chez l'Homme, ces microorganismes sont composés en grande partie de bactéries mais aussi d'archées, de virus, d'eucaryotes unicellulaires et de mycètes, tapissant toutes les surfaces et cavités en contact avec l'extérieur. Ainsi, notre espèce ne possède pas un, mais plusieurs microbiotes propres à chaque partie du corps colonisée (peau, bouche, poumon, vagin, etc.). L'ensemble des micro-organismes résidant dans notre tube digestif est appelé le microbiote intestinal.

/// Le microbiote intestinal regroupe l'ensemble des micro-organismes résidant dans notre tube digestif ///

Le microbiote intestinal est le plus connu et le plus imposant. Et pour cause, avec un poids réestimé à 0,2 kg, quelque 39 000 milliards de bactéries (soit à peu près autant que de cellules humaines) réparties sur un millier d'espèces et regroupant alors plus de 600 000 gènes (soit environ 25 fois plus que nos 23 000 gènes d'*Homo sapiens*), le microbiote intestinal apparaît comme un organe à part entière. Ce géant microbien à l'interface entre l'environnement extérieur (ou lumière intestinale), et l'épithélium intestinal est fermement inscrit dans la physiologie de son hôte. Si l'existence du microbiote intestinal est connue depuis des années (rappelons-nous des travaux de Theodor Escherich en 1886 qui isola 19 bactéries différentes dont *Escherichia Coli* dans les selles d'enfants), ce n'est que depuis le début des années 2000 que la richesse et la complexité des interactions entre la flore intestinale et son hôte sont activement étudiées.

On commence tout juste à effleurer la surface des implications et de l'importance capitale de ces micro-compagnons de vie sur notre organisme.

L'établissement du microbiote intestinal : un ami de longue date

Si la présence d'une colonisation *in utero* par le microbiote placentaire est une hypothèse qui reste à confirmer, la transmission du microbiote vaginal maternel lors de l'accouchement est la première et principale contribution à l'établissement du microbiote du nouveau-né. Ce microbiote primordial ne sera donc pas le même suivant le mode de naissance (voie basse ou césarienne).

Le tube digestif du nouveau-né étant un environnement aérobie, les premières bactéries à s'installer sont aérobies et aérobie-facultatives. Ces bactéries vont consommer le dioxygène, générant progressivement un environnement favorable à la croissance de bactéries anaérobies strictes entre une et deux semaines de vie. Au cours des premières années de vie, la composition du microbiote est instable et est impactée par le mode d'alimentation du nourrisson (lait maternel vs. formule infantile, sevrage et début de la diversification alimentaire), mais aussi par la génétique de l'enfant, son environnement ou encore des traitements médicamenteux chez le jeune ou la mère allaitante. Le microbiote s'enrichit progressivement en diverses espèces pour aboutir, vers l'âge de deux à cinq ans, à une composition complexe et stable, similaire à celle de l'adulte (*figure 1A*).

/// Le microbiote commence à s'établir à la naissance et se stabilise vers l'âge de deux à cinq ans ///

Au cours de la vie adulte, le microbiote reste tout de même influençable par l'alimentation, le mode de vie (sportif/sédentaire), le lieu de vie (campagne/ville), la physiologie de l'hôte, la prise d'antibiotiques ou autres traitements ou

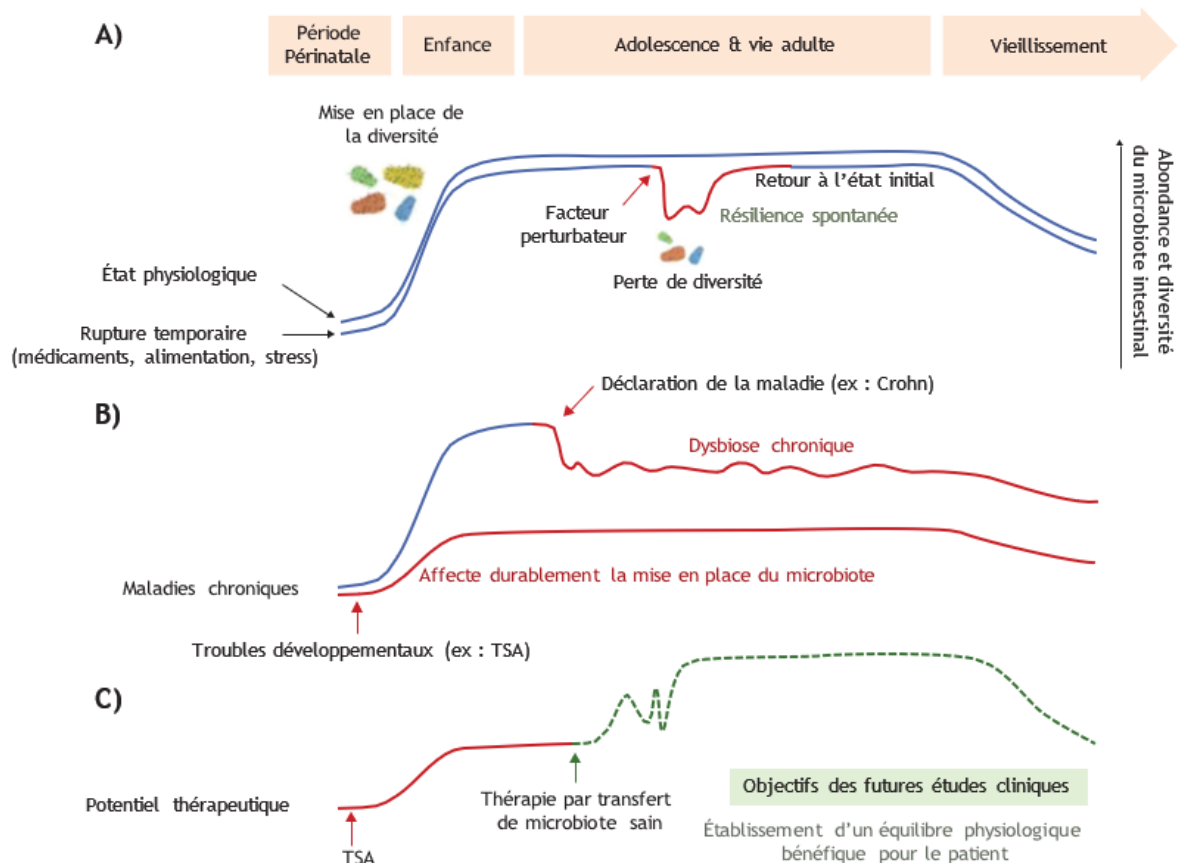


Figure 1 • Modélisation de la composition du microbiote intestinal au cours de la vie. (A) Évolution du microbiote en condition physiologique et avec un événement perturbateur au cours de la vie. La résilience du microbiote permet un retour à la normale de la composition microbienne. (B) Les maladies chroniques sont associées à une altération de la composition du microbiote intestinal, comme observé chez l'enfant (troubles du spectre de l'autisme, TSA) et chez l'adulte (maladie de Crohn). (C) Des thérapies ciblant le microbiote visent à rétablir un équilibre physiologique entre le microbiote intestinal et son hôte. Cette approche constitue un objectif thérapeutique dans la prise en charge des TSA et ses troubles gastro-intestinaux associés, mais aussi dans le traitement d'autres maladies chroniques, digestives ou non.

encore certaines maladies... En somme, toute la vie de l'individu [1]. Malgré ces influences, le microbiote possède des propriétés de résilience qui le rendent stable (un état basal de chaque individu). La résilience est la capacité du microbiote à assimiler des modifications ponctuelles provenant de son environnement (changement d'alimentation ponctuelle, médication sur une courte période) et à revenir à un état de base stable (figure 1A). Ce phénomène de résilience protège l'hôte contre des déséquilibres de la composition ou du métabolisme du microbiote intestinal pouvant aboutir à une baisse de la diversité (par disparition ou prédominance de certaines espèces bactériennes).

/// La capacité de résilience du microbiote permet de maintenir une composition microbienne stable malgré les influences de la vie ///

Pour un microbiote sain, richesse et diversité sont la clé

Comme une empreinte digitale, chaque microbiote est unique et propre à son hôte. De ce fait, il est difficile d'établir une composition microbienne type définissant un microbiote sain. On peut néanmoins distinguer deux paramètres importants dans l'équilibre entre la flore intestinale et son hôte : richesse et diversité. La richesse représente le nombre d'espèces de bactéries différentes au sein d'un échantillon et la diversité correspond à l'abondance relative de chaque espèce.

Une diversité et une richesse importante des espèces microbiennes dans les différentes régions du tube digestif semblent être associées à une meilleure santé métabolique [1]. Cette diversité tend à diminuer avec l'âge ou suite à des stress physiologiques comme des maladies chroniques et métaboliques. Une étude menée par Le Chatelier *et al.* s'intéressant au microbiote de personnes souffrant d'obésité montre que les individus présentant le microbiote le plus pauvre (380 000 gènes en moyenne contre 600 000 attendus) sont aussi ceux qui présentent l'adiposité la plus élevée ainsi qu'une résistance à l'insuline et une dyslipémie les plus prononcées [2]. Cependant, la diversité bactérienne n'est pas uniquement associée à une bonne santé puisque dans certains troubles digestifs, tels que la constipation, une augmentation de la diversité microbienne est observée [1].

Les critères de diversité et richesse bactérienne ont amené au concept de dysbiose, définissant des altérations de composition du microbiote. Ces dysbioses sont révélées par rapport à un état physiologique originel ou par rapport à un groupe de population témoin considéré indemne de maladie. Cette atteinte dans l'homéostasie modifie les très nombreux dialogues microbiote/hôte et mène à des situations pathologiques digestives et extradiigestives, compromettant les fonctions physiologiques cruciales du microbiote.

/// La dysbiose définit des altérations de composition du microbiote, pouvant être à l'origine de maladies digestives et extradiigestives ///

Les fonctions du microbiote intestinal

Il existe une relation symbiotique entre le microbiote et son hôte qui apporte un bénéfice pour chacune des parties : le microbiote intestinal assure son propre métabolisme en puisant dans nos aliments et parallèlement, participe au bien-être de l'hôte. En effet, il joue un rôle direct dans la digestion et l'assimilation des nutriments, régule l'homéostasie de la barrière intestinale et

le transit. Cette contribution au métabolisme de l'hôte est telle que les besoins énergétiques des modèles animaux dépourvus de microbiote (axéniques) sont 20 à 30 % supérieurs à leurs congénères colonisés [3]. Certains lipides et protéines résiduels sont métabolisés par notre microbiote, participant à la synthèse de vitamines telles que la vitamine K, B8, B12 et B9. Les fibres alimentaires, constituées de polysaccharides d'origine végétale et non digestibles par l'Homme, sont hydrolysées et fermentées par notre flore intestinale. Les produits ainsi générés sont majoritairement des acides gras à chaînes courtes dont font partie l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces métabolites bactériens agissent dans la régulation de nombreuses fonctions digestives et extra-digestives.

/// Le microbiote intestinal se nourrit des aliments de l'hôte et produit de nombreuses molécules contribuant à sa santé ///

De concert avec le mucus intestinal qui tapisse la paroi du tube digestif, le microbiote intestinal représente une véritable ligne de défense pour l'hôte en limitant considérablement l'installation de bactéries pathogènes dans le tube digestif. Il impose une compétition pour les sites d'adhérence sur la paroi intestinale et pour l'utilisation des nutriments, et peut même produire des substances antimicrobiennes (bactériocines ou peroxyde d'hydrogène), créant ainsi un environnement hostile pour les bactéries pathogènes. La fonction immunitaire du microbiote intestinal s'étend également à l'éducation de notre propre système immunitaire en contribuant à la formation de cellules spécialisées de l'immunité innée (cellules lymphoïdes innées) et acquise (lymphocyte T). Ainsi, sans microbiote, le développement et la maturation du système immunitaire sont diminués comme cela a pu être montré chez des souris axéniques [4]. Chez l'Homme, des liens ont été mis en évidence entre microbiote et plusieurs maladies liées à un dérèglement du système immunitaire, comme c'est le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Les personnes avec MICI ont une composition bactérienne intestinale moins riche et moins diverse que des personnes non atteintes mais on ignore encore s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de ces maladies (figure 1B). Certains éléments génétiques renforcent le lien entre MICI et microbiote. Plusieurs mutations de gènes identifiés chez les patients atteints de la maladie de Crohn correspondent à des gènes impliqués dans les interactions entre le microbiote et les cellules de l'hôte [5]. C'est notamment le cas du gène *NOD2* qui code pour un récepteur reconnaissant des peptidoglycanes produits par les bactéries, et qui participe à l'arsenal de défense contre les micro-organismes pathogènes. Ainsi, ces mutations impacteraient les mécanismes de reconnaissance des bactéries par les cellules de l'hôte, déclenchant des réactions immunitaires non adaptées et des inflammations chroniques de l'intestin.

/// Le microbiote intestinal forme une barrière écologique contre les bactéries pathogènes et participe à l'éducation du système immunitaire ///

/// L'implication du microbiote intestinal dans les MICI est fortement suggérée ///

Outre ces fonctions digestives et immunitaires, le microbiote intestinal exerce des actions sur bien d'autres systèmes et organes, en particulier sur le système nerveux. Le système nerveux le plus proche anatomiquement du microbiote intestinal est le système nerveux entérique (SNE). Il est présent tout le long du

tube digestif et régule les fonctions digestives. Il est également en lien avec le cerveau par l'intermédiaire du nerf vague dont 80 % des fibres transmettent des informations de l'intestin vers le cerveau. Plusieurs études menées chez la souris montrent que le microbiote est essentiel à la maturation des neurones entériques et des fonctions digestives. En effet, des souris axéniques ont moins de neurones entériques et présentent une réduction de la motricité intestinale [6]. Inversement, le SNE semble aussi moduler la composition du microbiote intestinal mais les mécanismes restent à identifier.

Le microbiote intestinal agit également sur le fonctionnement du cerveau, notamment en modulant l'expression de molécules neuroactives. Ainsi, des souris dont le microbiote est altéré ou absent présentent une augmentation de l'activité exploratoire associée à une diminution du comportement de type anxieux, des déficits de mémoire et une détérioration des comportements sociaux. Ces atteintes comportementales peuvent être rétablies par l'inoculation du microbiote de souris contrôles [7]. Ces observations ont amené à postuler l'existence d'un axe microbiote-intestin-cerveau, dont des dysfonctions pourraient être à l'origine, ou du moins participer, à certaines maladies du cerveau.

Allant dans ce sens, l'analyse de groupes de patients atteints de maladies neuropsychiatriques (dépression, schizophrénie, troubles du spectre de l'autisme) montre que leur microbiote intestinal diffère de celui présent chez des personnes non atteintes. Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) semblent être particulièrement liés à une atteinte de l'axe microbiote-intestin-cerveau. Les TSA sont des troubles neurodéveloppementaux caractérisés par des déficits des interactions sociales ainsi que des comportements et intérêts restreints et répétitifs. Environ 70 % des personnes avec TSA présentent des troubles gastro-intestinaux (constipation, diarrhées, ballonnements). Le premier lien établi entre microbiote intestinal et TSA provient d'études révélant une composition différente du microbiote fécal chez des enfants avec TSA comparée au microbiote d'enfants neurotypiques (*figure 1B*). Pour étudier les conséquences du microbiote altéré dans les TSA, le microbiote fécal d'enfants avec TSA a été transféré chez la souris, ce qui a induit un comportement de type autistique chez ces souris (augmentation d'un comportement répétitif et diminution des interactions sociales). Ces résultats suggèrent que le microbiote altéré dans les TSA contribuerait aux symptômes comportementaux [8]. De plus, des modèles de souris de TSA induit par un stress immunitaire ou nutritionnel montrent une amélioration des symptômes comportementaux et gastro-intestinaux après transplantation de microbiote provenant de souris témoins, ou après traitement par un probiotique (bactéries vivantes exerçant une action bénéfique sur la physiologie de l'hôte) [9].

/// Le microbiote intestinal est un régulateur de l'axe intestin-cerveau, en agissant sur le système nerveux entérique et le système nerveux central ///

/// L'activité du microbiote intestinal pourrait contribuer aux troubles du spectre de l'autisme ///

Cibler le microbiote : la médecine de demain

Les connaissances nouvellement acquises sur le microbiote intestinal ouvrent de nouvelles perspectives, tant diagnostiques que thérapeutiques. La modulation du microbiote intestinal par l'utilisation de probiotiques, prébiotiques ou des deux combinés (symbiotiques) constitue un véritable

espoir pour la médecine d'aujourd'hui et de demain. La transplantation de microbiote fécal issu de sujets sains a d'ores et déjà montré son efficacité pour le traitement de la colite récurrente à *Clostridium difficile* et représente à ce jour la seule indication validée pour la transplantation de microbiote fécal. Dans les MICI, plusieurs études cliniques basées sur la transplantation de microbiote fécal ont été conduites mais les résultats préliminaires montrent une efficacité très relative. Ce type d'approches a également été utilisé dans les TSA. Les premiers résultats à partir d'études cliniques pilotes ont montré une amélioration des troubles gastro-intestinaux et comportementaux chez les enfants traités, et cela jusqu'à deux ans après le traitement (*figure 1C*) [10]. Moduler le microbiote pour soigner représente une approche thérapeutique qui doit encore être confirmée par d'autres études. D'autres stratégies thérapeutiques ne ciblant qu'une ou quelques souches bactériennes pouvant être à l'origine de dysbiose chez les patients sont à l'étude. Par exemple, l'utilisation de molécules agissant directement sur le métabolisme des bactéries d'intérêts ou encore l'utilisation de virus bactériophages ciblant une population dysbiosique de bactéries chez le patient sont des pistes actuelles de recherche [1].

Le potentiel diagnostique et thérapeutique du microbiote intestinal est en pleine émergence dans des maladies digestives et cérébrales

Conclusion

Le microbiote intestinal constitue un organe à part entière, au centre des interactions entre notre organisme et l'environnement. Son action sur notre santé et dans plusieurs maladies chez le jeune comme chez l'adulte, fait de lui une cible thérapeutique innovante et prometteuse. Les recherches futures devraient conduire à de nouvelles stratégies de traitement et de gestion de notre microbiote pour améliorer la santé.

Liens d'intérêts :

les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

Les références importantes apparaissent en gras.

- 1 • Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* 2021 ; 19 : 55-71.
- 2 • Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013 ; 500 : 541-6.
- 3 • Bäckhed F, Ding H, Wang T, *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 15718-23.
- 4 • Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* 2007 ; 19(2) : 59-69.
- 5 • Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 2020 ; 145(1) : 16-27.
- 6 • Veiga-Fernandes H, Pachnis V. Neuroimmune regulation during intestinal development and homeostasis. *Nat Immunol* 2017 ; 18(2) : 116-22.
- 7 • Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry* 2014 ; 19(2) : 146-8.
- 8 • Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, *et al.* Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Int J Stroke* 2018 ; 13(6) : 612-32.
- 9 • Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, *et al.* Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell* 2013 ; 155(7) : 1451-63.
- 10 • Kang DW, Adams JB, Coleman DM, *et al.* Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep* 2019 ; 9(1) : 5821.

Courte revue, publiée dans la revue médicale Pratiques en Nutrition

L'axe microbiote-intestin-cerveau : un ménage à trois

Justine Marchix, **Morgane E. Le Dréan**, Michel Neunlist, Hélène Boudin

Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, F-44000 Nantes, France Doi : 10.1016/j.pranut.2023.05.003 Vol 19 - N° 75 P. 10-12 - juillet 2023

I. L'axe intestin-cerveau

L'axe intestin-cerveau représente les interactions entre ces deux organes clefs, au cœur de la survie des espèces animales et de leur santé. En effet, le tube digestif et le cerveau ont pour mission première, conservée au cours de l'évolution des espèces, de 1) fournir les nutriments nécessaires à la croissance et à la survie des organismes et 2) favoriser l'adaptation des espèces aux changements environnementaux rencontrés au cours de la vie. En particulier, les structures cérébrales primitives conservées à travers l'évolution des espèces régulent des fonctions cérébrales mises en jeu dans la recherche de nourriture (hippocampe-mémoire; amygdale-anxiété) et dans les comportements alimentaires (circuit de la récompense – satiété). De plus, le tube digestif est le deuxième organe neurologique après le cerveau, renforçant ainsi les liens entre l'intestin et le cerveau (1). En effet, il héberge, du tiers inférieur de l'œsophage jusqu'au rectum, un système nerveux intégratif et autonome : le système nerveux entérique (SNE). Il régule, indépendamment du cerveau, les principales fonctions digestives (motricité, absorption et transport des électrolytes/nutriments) et immunitaires. De manière intéressante, le SNE est issu des cellules de la plaque neurale, elle-même à l'origine du cerveau, qui vont coloniser l'ensemble du tube digestif très précocement durant la période embryonnaire (2). Cette similarité organisationnelle et moléculaire entre les deux systèmes nerveux est aussi au cœur des comorbidités fréquentes entre ces deux organes au cours de leurs pathologies respectives.

Les interactions entre l'intestin et le cerveau utilisent deux voies de communications préférentielles. D'une part, une voie humorale permettant aux médiateurs produits dans le cerveau ou l'intestin (nutriments, cytokines, lipides, composés bactériens, facteurs endocriniens) d'être transportés d'un organe vers l'autre et de réguler leurs fonctions respectives. D'autre part, une innervation extrinsèque, parasympathique (vagale ou sacrée) ou sympathique (ganglion coélique, ganglion mésentérique supérieur ou inférieur) permettant à la fois une interaction plus rapide et aussi plus ciblée entre les deux organes. Parmi les structures cellulaires jouant un rôle central dans la communication entre l'intestin et le cerveau figure un sous-type de cellules épithéliales, i.e. les cellules entéroendocrines, dont l'organisation anatomique permet une fonction à la fois endocrine (*via* une libération de médiateurs dans la circulation sanguine) et aussi *via* une probable voie 'synaptique' connectant le SNE et le nerf vague.

Enfin, cette communication homéostatique inter-organe entre l'intestin et le cerveau est aussi modulée par de nombreux facteurs environnementaux auxquels le tube digestif est en particulier exposé (nutriments, microbiote, toxines, polluants...). Parmi ces facteurs environnementaux, le microbiote intestinal a attiré une attention particulière ces 15 dernières années pour son rôle de plus en plus reconnu comme acteur de la santé et des maladies digestives et du cerveau (3).

II. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, champignons, parasites...) présents dans le tractus digestif. Parmi les différents microbiotes présents dans notre organisme, le microbiote intestinal est le plus densément peuplé, pouvant atteindre 10^{14} bactéries. Au sein du tractus digestif, la densité bactérienne suit un gradient, avec de faibles

concentrations au niveau de l'estomac et des concentrations plus importantes à partir de l'iléon jusqu'au colon. Ce gradient répond à l'existence de différents écosystèmes présents dans les segments du tube digestif (oxygène, pH, peptides antimicrobiens...). Il existe une biogéographie longitudinale mais aussi circulaire. On distingue le microbiote luminal, présent dans la lumière du tube digestif, du microbiote adhérent ou associé à la muqueuse (présent dans des biopsies) dont la composition diffère (4).

Le tube digestif est colonisé à la naissance par la transmission du microbiote maternel et des microbes environnants. Le microbiote intestinal évolue au cours des premières années de vie, sous l'influence de nombreux facteurs tels que l'alimentation, les antibiotiques ou encore la génétique de l'hôte. On considère que chez l'adulte, le microbiote intestinal est relativement stable et résilient (5).

Le microbiote intestinal est composé de bactéries appartenant majoritairement aux phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. Les 10% de bactéries restantes appartiennent notamment aux phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* ou encore *Fusobacteria*. Une étude a montré que le microbiote intestinal humain pouvait être classé selon trois profils distincts caractérisés par des genres bactériens dominants, appelés entérotypes (6). On estime que le microbiote intestinal est composé d'environ un millier d'espèces différentes mais dont seule une quinzaine d'espèces seraient communes entre tous les individus. Le microbiote intestinal de l'adulte constitue ainsi une sorte de carte d'identité de l'individu.

Il existe une relation symbiotique entre un microbiote sain et l'organisme qui l'abrite. Grâce au développement des outils de séquençage et de bio-informatiques, la composition et les rôles du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte sont de mieux en mieux caractérisés (7). En participant à la digestion et à la fermentation de substrats non digestibles par l'organisme (fibres alimentaires) ainsi qu'à la biosynthèse d'acides biliaires ou de vitamines, le microbiote intestinal contribue à la régulation métabolique et énergétique de l'hôte. Il participe également à la maturation du système immunitaire et la protection contre des pathogènes.

III. Le rôle du microbiote intestinal dans la physiologie intestinale et cérébrale

Le microbiote intestinal intervient tout au long de la vie sur les fonctions de cet organe, mais également sur d'autres organes plus distants, en particulier le cerveau.

Le microbiote régule les fonctions digestives et le système nerveux entérique

C'est essentiellement grâce à des modèles de souris dépourvues de micro-organismes suite à un traitement antibiotique ou par élevage en milieu stérile (souris axéniques) que les effets du microbiote sur la physiologie intestinale de l'hôte ont été découverts. Le microbiote intestinal joue un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale. Il a ainsi été montré qu'il pouvait agir sur la structuration de la barrière épithéliale et favoriser la maturation du tube digestif, notamment en promouvant le nombre de neurones et de cellules gliales entériques du SNE et en facilitant la motricité intestinale (8,9). Il joue également un rôle sur l'expression de neurotransmetteurs par les neurones entériques. Les signaux produits par le microbiote intestinal et pouvant agir sur la physiologie intestinale incluent des constituants de la paroi bactérienne (LPS) et des molécules produites par le métabolisme bactérien comme les acides gras à chaîne courte (AGCC) ou les acides biliaires secondaires (10).

Le cerveau sous l'influence du microbiote intestinal

Plusieurs éléments provenant d'études chez la souris indiquent que le microbiote intestinal maternel régulerait le développement et le fonctionnement du cerveau du fœtus. Par exemple, la barrière hémato-encéphalique, une membrane contrôlant les échanges entre le cerveau et la circulation

sanguine qui se construit au stade fœtal, présente une perméabilité plus élevée chez des fœtus de mères sans microbiote (11). Le traitement de ces mères gestantes avec du butyrate, un métabolite bactérien de la famille des AGCC, réduit ces altérations. La structuration du cerveau au stade fœtal est également soumise à l'action du microbiote maternel qui participe à la formation des axones, fibres nerveuses permettant la connexion entre neurones. Sans microbiote maternel, des défauts de communication entre régions cérébrales sont observés chez le nouveau-né et se traduisent par des défauts de perception sensorielle à l'âge adulte (12). Ces effets peuvent être partiellement contrecarrés par une recolonisation des mères gestantes avec des bactéries *Clostridia*. Au stade adulte, plusieurs études ont montré la contribution du microbiote intestinal dans les fonctions cérébrales associées à des comportements de type cognitif et émotionnel, comme par exemple la mémoire et l'anxiété (13). Les comportements sociaux semblent être également dépendants du microbiote intestinal. Ainsi, des souris sans microbiote présentent des altérations dans leurs interactions sociales qui sont rétablies après un transfert de microbiote fécal issu de souris témoins (14). Les mécanismes d'action de ce dialogue entre le microbiote et le cerveau incluent des voies humorales et nerveuses, en particulier vagale.

IV. Le microbiote intestinal en dysbiose et pathologies de l'intestin et du cerveau

Les altérations de la composition et des fonctions du microbiote, appelées dysbiose, impactent de nombreux dialogues microbiote/hôte et peuvent conduire à des troubles digestifs et extradiigestifs.

Le système digestif, le premier touché par la dysbiose

Plusieurs maladies gastro-intestinales sont associées à une dysbiose du microbiote intestinal, telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII) ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), regroupant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces pathologies digestives se caractérisent par de nombreux dérèglements intestinaux (diarrhée, ballonnement, maux de ventre intenses) et une réduction de la qualité de vie. L'altération du microbiote intestinal dans ces pathologies représente un biomarqueur mais également une cible thérapeutique. De nombreuses approches sont en développement pour prévenir ou restaurer ce microbiote altéré, telles que les prébiotiques, probiotiques, postbiotiques ou encore la transplantation de microbiote fécal (TMF) (15). En particulier, il a été montré que des combinaisons de souches probiotiques ou encore la souche probiotique *Bacillus coagulans* sont capables d'améliorer les symptômes gastro-intestinaux ainsi que la qualité de vie de patients atteints de SII (16). Néanmoins, la diversité des symptômes et les mécanismes sous-jacents représentent encore un défi majeur dans le traitement de ces pathologies digestives et nécessiteront le développement d'approches thérapeutiques plus personnalisées.

Dysbiose et troubles neurologiques

De plus en plus de troubles neurologiques sont étudiés sous le spectre du microbiote intestinal. Dans les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et Alzheimer, des atteintes digestives et une altération de la composition du microbiote intestinal ont été montrées (17). Dans la dépression, le transfert du microbiote intestinal de souris dépressives est capable de reproduire ces symptômes chez les souris receveuses. Ces troubles dépressifs ont pu être atténués par un traitement avec la souche probiotique *Lactobacilli* genus combiné à une stimulation du système endocannabinoïde (18). Dans les troubles neurodéveloppementaux comme les troubles du spectre de l'autisme (TSA), de nombreuses études ont également mis en évidence une altération de la composition du microbiote intestinal. On constate également que les troubles gastro-intestinaux constituent une des principales comorbidités des TSA. Aussi, des traitements basés sur des probiotiques ou la TMF sont également à l'étude dans le traitement de ces troubles (19). En particulier, il a été montré que le transfert de microbiote fécal d'enfants neurotypiques chez des enfants avec TSA induit des améliorations durables des troubles autistiques et également des atteintes gastro-

intestinales (20). Les mécanismes par lesquels la dysbiose intestinale affecte ces différentes pathologies digestives et neurologiques sont encore mal compris, mais des déséquilibres dans la production de neurotransmetteurs et/ou de métabolites bactériens pourraient contribuer à ces déséquilibres de l'axe microbiote-intestin-cerveau.

Conclusion

Ainsi, le microbiote intestinal peut moduler le développement et le fonctionnement de l'intestin et du cerveau en agissant directement ou indirectement, à travers des facteurs et des mécanismes miroirs, sur les deux systèmes nerveux. Des altérations de la composition et/ou du métabolisme du microbiote intestinal observées au cours de pathologies peuvent (co)contribuer aux dysfonctions de l'axe intestin-cerveau, conduisant à des comorbidités digestives et comportementales. Ainsi, la restauration de la fonctionnalité du microbiote intestinal devient un enjeu majeur dans la prévention ou prise en charge thérapeutique des pathologies de l'intestin et du cerveau.

Confit d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Financements :

Fondation Fondamental, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Microbiotisme et ExtraNeuro), région Pays de la Loire (Enterautisme).

Références

1. Sharkey KA, Mawe GM. The enteric nervous system. *Physiol Rev.* 1 avr 2023;103(2):1487-564.
2. Nagy N, Goldstein AM. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin Cell Dev Biol.* juin 2017;66:94-106.
3. Margolis KG, Cryan JF, Mayer EA. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology.* avr 2021;160(5):1486-501.
4. Wu M, Li P, Li J, An Y, Wang M, Zhong G. The Differences between Luminal Microbiota and Mucosal Microbiota in Mice. *J Microbiol Biotechnol.* 28 févr 2020;30(2):287-95.
5. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* sept 2012;489(7415):220-30.
6. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* mai 2011;473(7346):174-80.
7. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 7 août 2015;21(29):8787-803.
8. Collins J, Borojevic R, Verdu EF, Huizinga JD, Ratcliffe EM. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* janv 2014;26(1):98-107.
9. Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S, Chng SH, Snippert HJ, Clevers H, et al. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron.* 21 janv 2015;85(2):289-95.
10. Suply E, de Vries P, Soret R, Cossais F, Neunlist M. Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 15 juin 2012;302(12):G1373-1380.
11. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med.* 19 nov 2014;6(263):263ra158.
12. Vuong HE, Pronovost GN, Williams DW, Coley EJL, Siegler EL, Qiu A, et al. The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature.* oct 2020;586(7828):281-6.
13. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 15 févr 2011;108(7):3047-52.
14. Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry.* févr 2014;19(2):146-8.
15. Lê A, Mantel M, Marchix J, Bodinier M, Jan G, Rolli-Derkinderen M. Inflammatory bowel disease therapeutic strategies by modulation of the microbiota: how and when to introduce pre-, pro-, syn-, or postbiotics? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* déc 2022;323(6):G523-53.
16. Zhang T, Zhang C, Zhang J, Sun F, Duan L. Efficacy of Probiotics for Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:859967.

17. Cryan JF, O’Riordan KJ, Sandhu K, Peterson V, Dinan TG. The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol.* févr 2020;19(2):179-94.
18. Chevalier G, Siopi E, Guenin-Macé L, Pascal M, Laval T, Rifflet A, et al. Effect of gut microbiota on depressive-like behaviors in mice is mediated by the endocannabinoid system. *Nat Commun.* 11 déc 2020;11(1):6363.
19. Oroojzadeh P, Bostanabad SY, Lotfi H. Psychobiotics: the Influence of Gut Microbiota on the Gut-Brain Axis in Neurological Disorders. *J Mol Neurosci.* 2022;72(9):1952-64.
20. 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(1):5821.

Références

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra65–237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Abdo, H., Mahé, M. M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., & Lardeux, B. (2012). The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 11), 2739–2750. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222935>
- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., & Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism – comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterology*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-22>
- Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 98(2), 229–238. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x>
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 12(Suppl 1), 5–16. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>
- Al Alam, D., Danopoulos, S., Grubbs, B., Ali, N. A. B. M., MacAogain, M., Chotirmall, S. H., Warburton, D., Gaggar, A., Ambalavanan, N., & Lal, C. V. (2020). Human Fetal Lungs Harbor a Microbiome Signature. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(8), 1002–1006. <https://doi.org/10.1164/rccm.201911-2127LE>
- Al-Ayadhi, L., Zayed, N., Bhat, R. S., Moubayed, N. M. S., Al-Muammar, M. N., & El-Ansary, A. (2021). The use of biomarkers associated with leaky gut as a diagnostic tool for early intervention in autism spectrum disorder: A systematic review. *Gut Pathogens*, 13(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00448-y>
- Alberto González-Regueiro, J., Moreno-Castañeda, L., Uribe, M., & Carlos Chávez-Tapia, N. (2017). The Role of Bile Acids in Glucose Metabolism and Their Relation with Diabetes. *Annals of Hepatology*, 16, S15–S20. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5494>
- Alemi, F., Poole, D. P., Chiu, J., Schoonjans, K., Cattaruzza, F., Grider, J. R., Bunnett, N. W., & Corvera, C. U. (2013). The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice. *Gastroenterology*, 144(1), 145–154. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.055>

- Altimiras, F., Garcia, J. A., Palacios-García, I., Hurley, M. J., Deacon, R., González, B., & Cogram, P. (2021). Altered Gut Microbiota in a Fragile X Syndrome Mouse Model. *Frontiers in Neuroscience*, 15. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.653120>
- Andersen-Civil, A. I. S., Sawale, R. A., & Vanwalleghem, G. C. (2023). Zebrafish (*Danio rerio*) as a translational model for neuro-immune interactions in the enteric nervous system in autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 112, 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.06.001>
- Anderson, J. S., Druzgal, T. J., Froehlich, A., DuBray, M. B., Lange, N., Alexander, A. L., Abildskov, T., Nielsen, J. A., Cariello, A. N., Cooperrider, J. R., Bigler, E. D., & Lainhart, J. E. (2011). Decreased Interhemispheric Functional Connectivity in Autism. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, 21(5), 1134–1146. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq190>
- Anderson, R. B., Bergner, A. J., Taniguchi, M., Fujisawa, H., Forrai, A., Robb, L., & Young, H. M. (2007). Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: A role for *Sema3A*, but not *Sema3F*. *Developmental Biology*, 305(1), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.020>
- Anderson, R. B., Newgreen, D. F., & Young, H. M. (2006). Neural Crest and the Development of the Enteric Nervous System. In J.-P. Saint-Jeannet (Ed.), *Neural Crest Induction and Differentiation* (Vol. 589, pp. 181–196). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46954-6_11
- APA (1985). *Diagnostic & Statistical manual of Mental Disorders : DSM-III*. (Washington, D.C.: American Psychiatric Association). APA (1998). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV*. (Washington, DC: American Psychiatric Association)
- APA (1998). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV*. (Washington, DC: American Psychiatric Association).
- APA (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V)* (American Psychiatric Pub).
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Auerbach, L. (1864). Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Pathol Anat Physiol* 457–460.
- Avolio, E., Olivito, I., Rosina, E., Romano, L., Angelone, T., De Bartolo, A., Scimeca, M., Bellizzi, D., D'Aquila, P., Passarino, G., Alò, R., Facciolo, R. M., Bagni, C., De Lorenzo, A., & Canonaco, M. (2022). Modifications of Behavior and Inflammation in Mice Following Transplant with Fecal Microbiota from Children with Autism. *Neuroscience*, 498, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.06.038>
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>

- Baghdadi, M. B., & Kim, T.-H. (2023). The multiple roles of enteric glial cells in intestinal homeostasis and regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 150–151, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2023.01.005>
- Bai, D., Yip, B. H. K., Windham, G. C., Sourander, A., Francis, R., Yoffe, R., Glasson, E., Mahjani, B., Suominen, A., Leonard, H., Gissler, M., Buxbaum, J. D., Wong, K., Schendel, D., Kodesh, A., Breshnahan, M., Levine, S. Z., Parner, E. T., Hansen, S. N., ... Sandin, S. (2019). Association of Genetic and Environmental Factors With Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*, 76(10), 1035–1043. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1411>
- Bailey, D. B., Raspa, M., Olmsted, M., & Holiday, D. B. (2008). Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: Findings from a national parent survey. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 146A(16), 2060–2069. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32439>
- Banerjee, E., Griffith, J., Kenyon, C., Christianson, B., Strain, A., Martin, K., McMahon, M., Bagstad, E., Laine, E., Hardy, K., Grilli, G., Walters, J., Dunn, D., Roddy, M., & Ehresmann, K. (2020). Containing a measles outbreak in Minnesota, 2017: Methods and challenges. *Perspectives in Public Health*, 140(3), 162–171. <https://doi.org/10.1177/1757913919871072>
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Baron-Cohen, S., Lombardo, M. V., Auyeung, B., Ashwin, E., Chakrabarti, B., & Knickmeyer, R. (2011). Why Are Autism Spectrum Conditions More Prevalent in Males? *PLOS Biology*, 9(6), e1001081. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001081>
- Barrasa, J. I., Olmo, N., Lizarbe, M. A., & Turnay, J. (2013). Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(2), 964–977. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.020>
- Barrenschee, M., Böttner, M., Harde, J., Lange, C., Cossais, F., Ebsen, M., Vogel, I., & Wedel, T. (2015). SNAP-25 is abundantly expressed in enteric neuronal networks and upregulated by the neurotrophic factor GDNF. *Histochemistry and Cell Biology*, 143(6), 611–623. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1310-x>
- Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G., & Elinav, E. (2016). Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinformatics and Biology Insights*, 10, BBI.S34610. <https://doi.org/10.4137/BBI.S34610>
- Baumgarten, H. G., Holstein, A.-F., & Owman, Ch. (1970). Auerbach's plexus of mammals and man: Electron microscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from rhesus monkeys, guinea-pigs and man. *Zeitschrift Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 106(3), 376–397. <https://doi.org/10.1007/BF00335780>
- Bayliss, W. M., & Starling, E. H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of Physiology*, 24(2), 99–143.
- Beam, A., Clinger, E., & Hao, L. (2021). Effect of Diet and Dietary Components on the Composition of the Gut Microbiota. *Nutrients*, 13(8), 2795. <https://doi.org/10.3390/nu13082795>

- Begeer, S., Bouk, S. E., Boussaid, W., Terwogt, M. M., & Koot, H. M. (2009). Underdiagnosis and Referral Bias of Autism in Ethnic Minorities. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 39(1), 142–148. <https://doi.org/10.1007/s10803-008-0611-5>
- Belkind-Gerson, J., Graham, H. K., Reynolds, J., Hotta, R., Nagy, N., Cheng, L., Kamionek, M., Shi, H. N., Aherne, C. M., & Goldstein, A. M. (2017). Colitis promotes neuronal differentiation of Sox2+ and PLP1+ enteric cells. *Scientific Reports*, 7, 2525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02890-y>
- Bermudez-Martin, P., Becker, J. A. J., Caramello, N., Fernandez, S. P., Costa-Campos, R., Canaguier, J., Barbosa, S., Martinez-Gili, L., Myridakis, A., Dumas, M.-E., Bruneau, A., Cherbuy, C., Langella, P., Callebert, J., Launay, J.-M., Chabry, J., Barik, J., Le Merrer, J., Glaichenhaus, N., & Davidovic, L. (2021). The microbial metabolite p-Cresol induces autistic-like behaviors in mice by remodeling the gut microbiota. *Microbiome*, 9(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01103-z>
- Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stessman, H. A., Coe, B. P., Penn, O., Witherspoon, K., Gerds, J., Baker, C., Vulto-van Silfhout, A. T., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., Fichera, M., Bosco, P., Buono, S., Alberti, A., Failla, P., Peeters, H., Steyaert, J., Vissers, L. E. L. M., ... Eichler, E. E. (2014). Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell*, 158(2), 263–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.017>
- Bezawada, N., Phang, T. H., Hold, G. L., & Hansen, R. (2020). Autism Spectrum Disorder and the Gut Microbiota in Children: A Systematic Review. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 76(1), 16–29. <https://doi.org/10.1159/000505363>
- Bhattacharya, A., Kaphzan, H., Alvarez-Dieppa, A. C., Murphy, J. P., Pierre, P., & Klann, E. (2012). Genetic removal of p70 S6 kinase 1 corrects molecular, synaptic, and behavioral phenotypes in fragile X syndrome mice. *Neuron*, 76(2), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.022>
- Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., Brigidi, P., & Vos, W. D. (2010). Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLOS ONE*, 5(5), e10667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010667>
- Biedermann, L., & Rogler, G. (2015). The intestinal microbiota: Its role in health and disease. *European Journal of Pediatrics*, 174(2), 151–167. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>
- Bishop, S. L., & Lord, C. (2023). Commentary: Best practices and processes for assessment of autism spectrum disorder – the intended role of standardized diagnostic instruments. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 64(5), 834–838. <https://doi.org/10.1111/jcpp.13802>
- Bleuler, E. (1950). *Dementia praecox or the group of schizophrenias* (p. 548). International Universities Press.
- Blom, H. J. (2009). Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 85(4), 295–302. <https://doi.org/10.1002/bdra.20581>
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., & Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia*, 63(2), 229–241. <https://doi.org/10.1002/glia.22746>

- Bölte, S., Neufeld, J., Marschik, P. B., Williams, Z. J., Gallagher, L., & Lai, M.-C. (2023). Sex and gender in neurodevelopmental conditions. *Nature Reviews. Neurology*, 19(3), 136–159. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00774-6>
- Bonaz, B., Bazin, T., & Pellissier, S. (2018). The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00049>
- Botár, J. (1967). Phylogenetic evolution of the vegetative nervous system. *Acta Neurovegetativa*, 30(1), 342–349. <https://doi.org/10.1007/BF01239910>
- Böttner, M., Fricke, T., Müller, M., Barrenschee, M., Deuschl, G., Schneider, S. A., Egberts, J.-H., Becker, T., Fritscher-Ravens, A., Ellrichmann, M., Schulz-Schaeffer, W. J., & Wedel, T. (2015). Alpha-synuclein is associated with the synaptic vesicle apparatus in the human and rat enteric nervous system. *Brain Research*, 1614, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.015>
- Böttner, M., Ghorbani, P., Harde, J., Barrenschee, M., Hellwig, I., Vogel, I., Ebsen, M., Förster, E., & Wedel, T. (2014). Expression and regulation of reelin and its receptors in the enteric nervous system. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 61, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.05.001>
- Böttner, M., Harde, J., Barrenschee, M., Hellwig, I., Vogel, I., Ebsen, M., & Wedel, T. (2013). GDNF induces synaptic vesicle markers in enteric neurons. *Neuroscience Research*, 77(3), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.08.012>
- Boukthir, S., Matoussi, N., Belhadj, A., Mammou, S., Dlala, S. B., Helayem, M., Rocchiccioli, F., Bouzaidi, S., & Abdennebi, M. (2010). [Abnormal intestinal permeability in children with autism]. *La Tunisie Medicale*, 88(9), 685–686.
- Brehmer, A. (2021). Classification of human enteric neurons. *Histochemistry and Cell Biology*, 156(2), 95–108. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02002-y>
- Brehmer, A., & Stach, W. (1998). Regional structural differences in the neuronal composition of myenteric ganglia along the pig small intestine. *The Anatomical Record*, 250(1), 109–116. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199801\)250:1<109::AID-AR11>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199801)250:1<109::AID-AR11>3.0.CO;2-S)
- Brehmer, A., Croner, R., Dimmler, A., Papadopoulos, T., Schrödl, F., & Neuhuber, W. (2004). Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience*, 112(1–2), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.03.005>
- Brenman, J. E., Christopherson, K. S., Craven, S. E., McGee, A. W., & Bredt, D. S. (1996). Cloning and Characterization of Postsynaptic Density 93, a Nitric Oxide Synthase Interacting Protein. *The Journal of Neuroscience*, 16(23), 7407–7415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-23-07407.1996>
- Bridgewater, L. C., Zhang, C., Wu, Y., Hu, W., Zhang, Q., Wang, J., Li, S., & Zhao, L. (2017). Gender-based differences in host behavior and gut microbiota composition in response to high fat diet and stress in a mouse model. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11069-4>
- Bromley, R. L., Mawer, G. E., Briggs, M., Cheyne, C., Clayton-Smith, J., García-Fiñana, M., Kneen, R., Lucas, S. B., Shallcross, R., Baker, G. A., & Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group.

- (2013). The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 84(6), 637–643. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304270>
- Brookes, S. J. H. (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical Record*, 262(1), 58–70. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<58::AID-AR1011>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<58::AID-AR1011>3.0.CO;2-V)
- Brookes, S. J. H., Spencer, N. J., Costa, M., & Zagorodnyuk, V. P. (2013). Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.29>
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., ... Dowell, S. J. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11312–11319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200>
- Bruni, T. P. (2014). Test Review: Social Responsiveness Scale–Second Edition (SRS-2). *Journal of Psychoeducational Assessment*, 32(4), 365–369. <https://doi.org/10.1177/0734282913517525>
- Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*, 165(7), 1762–1775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P. J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J. B., van Seuning, I., & Renes, I. B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: Implications for epithelial protection. *The Biochemical Journal*, 420(2), 211–219. <https://doi.org/10.1042/BJ20082222>
- Caillaud, M., Le Dréan, M. E., De-Guilhem-de-Lataillade, A., Le Berre-Scoul, C., Montnach, J., Nedellec, S., Loussouarn, G., Paillé, V., Neunlist, M., & Boudin, H. (2023). A functional network of highly pure enteric neurons in a dish. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 1062253. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1062253>
- Cameron, H. L., & Perdue, M. H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterology and Motility*, 19(1), 47–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2006.00845.x>
- Cao, H., Liu, X., An, Y., Zhou, G., Liu, Y., Xu, M., Dong, W., Wang, S., Yan, F., Jiang, K., & Wang, B. (2017). Dysbiosis contributes to chronic constipation development via regulation of serotonin transporter in the intestine. *Scientific Reports*, 7(1), 10322. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10835-8>
- Carbone, S. E., Jovanovska, V., Nurgali, K., & Brookes, S. J. H. (2014). Human enteric neurons: Morphological, electrophysiological, and neurochemical identification. *Neurogastroenterology and Motility*, 26(12), 1812–1816. <https://doi.org/10.1111/nmo.12453>
- Carissimi, C., Laudadio, I., Palone, F., Fulci, V., Cesi, V., Cardona, F., Alfonsi, C., Cucchiara, S., Isoldi, S., & Stronati, L. (2019). Functional analysis of gut microbiota and immunoinflammation in children with autism spectrum disorders. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian*

- Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 51(10), 1366–1374. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.06.006>
- Carlezon, W. A., Kim, W., Missig, G., Finger, B. C., Landino, S. M., Alexander, A. J., Mokler, E. L., Robbins, J. O., Li, Y., Bolshakov, V. Y., McDougle, C. J., & Kim, K.-S. (2019). Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 16928. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53294-z>
- Carlisi, C. O., Norman, L. J., Lukito, S. S., Radua, J., Mataix-Cols, D., & Rubia, K. (2017). Comparative Multimodal Meta-analysis of Structural and Functional Brain Abnormalities in Autism Spectrum Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder. *Biological Psychiatry*, 82(2), 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.10.006>
- Casanova, M. F., Casanova, E. L., Frye, R. E., Baeza-Velasco, C., LaSalle, J. M., Hagerman, R. J., Scherer, S. W., & Natowicz, M. R. (2020). Editorial: Secondary vs. Idiopathic Autism. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 297. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00297>
- Chaidez, V., Hansen, R. L., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 44(5), 1117–1127. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-1973-x>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Chaudhury, A., He, X.-D., & Goyal, R. K. (2009). Role of PSD95 in membrane association and catalytic activity of nNOS α in nitrergic varicosities in mice gut. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(4), G806–G813. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00279.2009>
- Chen, C., Liao, J., Xia, Y., Liu, X., Jones, R., Haran, J., McCormick, B., Sampson, T. R., Alam, A., & Ye, K. (2022). Gut microbiota regulate Alzheimer's disease pathologies and cognitive disorders via PUFA-associated neuroinflammation. *Gut*, 71(11), 2233–2252. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326269>
- Chen, K., Fu, Y., Wang, Y., Liao, L., Xu, H., Zhang, A., Zhang, J., Fan, L., Ren, J., & Fang, B. (2020). Therapeutic Effects of the In Vitro Cultured Human Gut Microbiota as Transplants on Altering Gut Microbiota and Improving Symptoms Associated with Autism Spectrum Disorder. *Microbial Ecology*, 80(2), 475–486. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01494-w>
- Chen, M. X., Wang, S.-Y., Kuo, C.-H., & Tsai, I.-L. (2019). Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118, S10–S22. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.09.007>
- Cheng, B., Zhu, J., Yang, T., Wang, S., Liu, H., Wu, Q., Zhang, X., Chen, J., & Li, T. (2020). Vitamin A deficiency exacerbates autism-like behaviors and abnormalities of the enteric nervous system in a valproic acid-induced rat model of autism. *NeuroToxicology*, 79, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.06.004>
- Cheng, M., & Ning, K. (2019). Stereotypes About Enterotype: The Old and New Ideas. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 17(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.02.004>

- Cheng, Y., Quinn, J. F., & Weiss, L. A. (2013). An eQTL mapping approach reveals that rare variants in the SEMA5A regulatory network impact autism risk. *Human Molecular Genetics*, 22(14), 2960–2972. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt150>
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2019). Bile Acids as Metabolic Regulators and Nutrient Sensors. *Annual Review of Nutrition*, 39, 175. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018-124344>
- Chisholm, K., Lin, A., Abu-Akel, A., & Wood, S. J. (2015). The association between autism and schizophrenia spectrum disorders: A review of eight alternate models of co-occurrence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 55, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.012>
- Choi, J., Lee, S., Won, J., Jin, Y., Hong, Y., Hur, T.-Y., Kim, J.-H., Lee, S.-R., & Hong, Y. (2018). Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *PloS One*, 13(2), e0192925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192925>
- Choi, L., & An, J.-Y. (2021). Genetic architecture of autism spectrum disorder: Lessons from large-scale genomic studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 128, 244–257. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.028>
- Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, 309(16), 1696–1703. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M. G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A., & Fiorucci, S. (2011). The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PloS One*, 6(10), e25637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025637>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'Connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., O'Mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., ... O'Toole, P. W. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), Article 7410. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Cleophas, M. C. P., Crişan, T. O., Lemmers, H., Toenhake-Dijkstra, H., Fossati, G., Jansen, T. L., Dinarello, C. A., Netea, M. G., & Joosten, L. A. B. (2016). Suppression of monosodium urate crystal-induced cytokine production by butyrate is mediated by the inhibition of class I histone deacetylases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(3), 593–600. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206258>
- Clerc, N., Furness, J. B., Kunze, W. A. A., Thomas, E. A., & Bertrand, P. P. (1999). Long-term effects of synaptic activation at low frequency on excitability of myenteric AH neurons. *Neuroscience*, 90(1), 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00431-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00431-X)
- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., & Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep23129>
- Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E. F., Huizinga, J. D., & Ratcliffe, E. M. (2014). Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility*, 26(1), 98–107. <https://doi.org/10.1111/nmo.12236>

- Comer, R., Westman, J., & Hoerstra, J. (2000). The Ohio State University College of Medicine and Public Health: *Academic Medicine*, 75(Supplement), S297–S299. <https://doi.org/10.1097/00001888-200009001-00086>
- Constantino, J. N., & Gruber, C. P. (2005). Social Responsiveness Scale (SRS). Los Angeles,
- Coretti, L., Cristiano, C., Florio, E., Scala, G., Lama, A., Keller, S., Cuomo, M., Russo, R., Pero, R., Paciello, O., Mattace Raso, G., Meli, R., Cocozza, S., Calignano, A., Chiariotti, L., & Lembo, F. (2017). Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, 7. Scopus. <https://doi.org/10.1038/srep45356>
- Cowan, C. S. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). Annual Research Review: Critical windows - the microbiota-gut-brain axis in neurocognitive development. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 61(3), 353–371. <https://doi.org/10.1111/jcpp.13156>
- Crafa, D., & Warfa, N. (2015). Maternal migration and autism risk: Systematic analysis. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 27(1), 64–71. <https://doi.org/10.3109/09540261.2014.995601>
- Crawley, J. N. (2012). Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(3), 293–305.
- Cristiano, C., Hoxha, E., Lippiello, P., Balbo, I., Russo, R., Tempia, F., & Miniaci, M. C. (2022). Maternal treatment with sodium butyrate reduces the development of autism-like traits in mice offspring. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 156, 113870. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113870>
- Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Sandhu, K., Peterson, V., & Dinan, T. G. (2020). The gut microbiome in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 19(2), 179–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4)
- D’Amato, A., Di Cesare Mannelli, L., Lucarini, E., Man, A. L., Le Gall, G., Branca, J. J. V., Ghelardini, C., Amedei, A., Bertelli, E., Regoli, M., Pacini, A., Luciani, G., Gallina, P., Altera, A., Narbad, A., Gulisano, M., Hoyles, L., Vauzour, D., & Nicoletti, C. (2020). Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome*, 8(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00914-w>
- D’Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Pacifico, L., Viozzi, L., Zaccagnini, M., Cardi, E., & Giardini, O. (1996). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 85(9), 1076–1079. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb14220.x>
- De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazanetti, D. I., Cristofori, F., Guerzoni, M. E., Gobbetti, M., & Francavilla, R. (2013). Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. *PLoS ONE*, 8(10), e76993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076993>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>

- de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Frolli, A., Iardino, P., Carteni, M., De Rosa, M., Francavilla, R., Riegler, G., Militerni, R., & Bravaccio, C. (2010). Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 51(4), 418–424. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181dccc4a5>
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Ercument Cicek, A., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S.-C., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., ... Buxbaum, J. D. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515(7526), Article 7526. <https://doi.org/10.1038/nature13772>
- de Theije, C. G. M., Wopereis, H., Ramadan, M., van Eijndthoven, T., Lambert, J., Knol, J., Garssen, J., Kraneveld, A. D., & Oozeer, R. (2014). Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.005>
- de Vries, P., Soret, R., Suply, E., Heloury, Y., & Neunlist, M. (2010). Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), G539–G547. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00092.2010>
- DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources. Firth, H.V. et al., 2009. *Am.J.Hum.Genet* 84, 524-533 (DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010))
- Deer, B. (2011). How the case against the MMR vaccine was fixed. *BMJ*, 342, c5347. <https://doi.org/10.1136/bmj.c5347>
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular Psychiatry*, 19(2), 146–148. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.65>
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- Di Tommaso, N., Gasbarrini, A., & Ponziani, F. R. (2021). Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(23), 12836. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312836>
- Dinan, K., & Dinan, T. G. (2022). Gut Microbes and Neuropathology: Is There a Causal Nexus? *Pathogens*, 11(7), 796. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070796>
- Ding, X., Xu, Y., Zhang, X., Zhang, L., Duan, G., Song, C., Li, Z., Yang, Y., Wang, Y., Wang, X., & Zhu, C. (2020). Gut microbiota changes in patients with autism spectrum disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 129, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.06.032>

- Dogiel AS (1899) Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säuge- thiere. *Arch Anat Physiol Leip Anat Abt*: 130–158
- Dougherty, J. D., Marrus, N., Maloney, S. E., Yip, B., Sandin, S., Turner, T. N., Selmanovic, D., Kroll, K. L., Gutmann, D. H., Constantino, J. N., & Weiss, L. A. (2022). Can the “female protective effect” liability threshold model explain sex differences in autism spectrum disorder? *Neuron*, 110(20), 3243–3262. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.020>
- Douzgou, S., Liang, H. W., Metcalfe, K., Somarathi, S., Tischkowitz, M., Mohamed, W., Kini, U., McKee, S., Yates, L., Bertoli, M., Lynch, S. A., Holder, S., Deciphering Developmental Disorders Study, & Banka, S. (2019). The clinical presentation caused by truncating CHD8 variants. *Clinical Genetics*, 96(1), 72–84. <https://doi.org/10.1111/cge.13554>
- Duan, Y., Wang, S.-H., Song, J., Mironova, Y., Ming, G., Kolodkin, A. L., & Giger, R. J. (2014). Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells. *eLife*, 3, e04390. <https://doi.org/10.7554/eLife.04390>
- Duan, Y., Zeng, L., Zheng, C., Song, B., Li, F., Kong, X., & Xu, K. (2018). Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9, 2649. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02649>
- Dulac, C., & Le Douarin, N. M. (1991). Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), 6358–6362.
- Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I. C., Anckarsäter, H., Sponheim, E., Goubran-Botros, H., Delorme, R., Chabane, N., Mouren-Simeoni, M.-C., de Mas, P., Bieth, E., Rogé, B., Héron, D., ... Bourgeron, T. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genetics*, 39(1), 25–27. <https://doi.org/10.1038/ng1933>
- Dworzynski, K., Ronald, A., Bolton, P., & Happé, F. (2012). How Different Are Girls and Boys Above and Below the Diagnostic Threshold for Autism Spectrum Disorders? *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 51(8), 788–797. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2012.05.018>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y.-J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T., & Fombonne, E. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 5(3), 160–179. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L., & Ornoy, A. (2016). Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*, 64, 116–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.024>
- Escherich, T. A. du texte. (1886). *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung / von Dr Theodor Escherich,...* <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k841569w>

- Esnafoglu, E., Cirrik, S., Ayyıldız, S. N., Erdil, A., Ertürk, E. Y., Dağlı, A., & Noyan, T. (2017). Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. *The Journal of Pediatrics*, 188, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.04.004>
- Esteban-Figuerola, P., Canals, J., Fernández-Cao, J. C., & Arija Val, V. (2019). Differences in food consumption and nutritional intake between children with autism spectrum disorders and typically developing children: A meta-analysis. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, 23(5), 1079–1095. <https://doi.org/10.1177/1362361318794179>
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Farré-Maduell, E., & Casals-Pascual, C. (2019). The origins of gut microbiome research in Europe: From Escherich to Nissle. *Human Microbiome Journal*, 14, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2019.100065>
- Faure, C., Chalazonitis, A., Rhéaume, C., Bouchard, G., Sampathkumar, S.-G., Yarema, K. J., & Gershon, M. D. (2007). Gangliogenesis in the enteric nervous system: Roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. *Developmental Dynamics*, 236(1), 44–59. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20943>
- Ferguson, B. J., Dovgan, K., Severns, D., Martin, S., Marler, S., Gross Margolis, K., Bauman, M. L., Veenstra-VanderWeele, J., Sohl, K., & Beversdorf, D. Q. (2019). Lack of Associations Between Dietary Intake and Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 528. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00528>
- Fetit, R., Price, D. J., Lawrie, S. M., & Johnstone, M. (2020). Understanding the clinical manifestations of 16p11.2 deletion syndrome: A series of developmental case reports in children. *Psychiatric Genetics*, 30(5), 136–140. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000259>
- Finegold, S. M., Dowd, S. E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K. E., Wolcott, R. D., Youn, E., Summanen, P. H., Granpeesheh, D., Dixon, D., Liu, M., Molitoris, D. R., & Green, J. A. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16(4), 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>
- Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M.-L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E. M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Summanen, P., Baysallar, M., Tomzynski, T. J., Read, E., Johnson, E., Rolfe, R., Nasir, P., ... Kaul, A. (2002). Gastrointestinal Microflora Studies in Late-Onset Autism. *Clinical Infectious Diseases*, 35(Supplement_1), S6–S16. <https://doi.org/10.1086/341914>
- Fiore, R., & Püschel, A. W. (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 8, s484-499. <https://doi.org/10.2741/1080>
- Flemström, G. (1986). Gastroduodenal mucosal secretion of bicarbonate and mucus. Physiologic control and stimulation by prostaglandins. *The American Journal of Medicine*, 81(2A), 18–22. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(86\)80005-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(86)80005-5)
- Fombonne, E. (2023). Editorial: Is autism overdiagnosed? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 64(5), 711–714. <https://doi.org/10.1111/jcpp.13806>

- Foong, D., Zhou, J., Zarrouk, A., Ho, V., & O'Connor, M. D. (2020). Understanding the Biology of Human Interstitial Cells of Cajal in Gastrointestinal Motility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4540. <https://doi.org/10.3390/ijms21124540>
- Foong, J. P. P., Nguyen, T. V., Furness, J. B., Bornstein, J. C., & Young, H. M. (2012). Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *The Journal of Physiology*, 590(10), 2375–2390. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225938>
- Fu, M., Chi Hang Lui, V., Har Sham, M., Nga Yin Cheung, A., & Kwong Hang Tam, P. (2003). HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Developmental Dynamics*, 228(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10350>
- Furness, J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81(1), 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00127-2)
- Furness, J. B. (2006). The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Autonomic Neuroscience*, 130(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.05.003>
- Furness, J. B. (2008). *The Enteric Nervous System*. John Wiley & Sons.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J. B., Alex, G., Clark, M. J., & Lal, V. V. (2003). Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. *The Anatomical Record*, 272A(2), 475–483. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10064>
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H.-J. (2014). The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. In M. Lyte & J. F. Cryan (Eds.), *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (Vol. 817, pp. 39–71). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *Journal of Anatomy*, 111(Pt 1), 69–97.
- Gabriele, S., Sacco, R., Altieri, L., Neri, C., Urbani, A., Bravaccio, C., Riccio, M. P., Iovene, M. R., Bombace, F., De Magistris, L., & Persico, A. M. (2016). Slow intestinal transit contributes to elevate urinary p-cresol level in Italian autistic children. *Autism Research*, 9(7), 752–759. <https://doi.org/10.1002/aur.1571>
- Gale, A. (2021). Dr. William Beaumont: Founding Father of Gastroenterology. *Missouri Medicine*, 118(6), 518–519.
- Galligan, J. J., Furness, J. B., & Costa, M. (1989). Migration of the myoelectric complex after interruption of the myenteric plexus: Intestinal transection and regeneration of enteric nerves in the guinea pig. *Gastroenterology*, 97(5), 1135–1146. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)91683-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)91683-1)
- Gan, H., Su, Y., Zhang, L., Huang, G., Lai, C., Lv, Y., & Li, Y. (2023). Questionnaire-based analysis of autism spectrum disorders and gastrointestinal symptoms in children and adolescents: A

- systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pediatrics*, 11, 1120728. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1120728>
- Gandal, M. J., Edgar, J. C., Ehrlichman, R. S., Mehta, M., Roberts, T. P. L., & Siegel, S. J. (2010). Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biological Psychiatry*, 68(12), 1100–1106. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.031>
- Gardner, R. M., Lee, B. K., Magnusson, C., Rai, D., Frisell, T., Karlsson, H., Idring, S., & Dalman, C. (2015). Maternal body mass index during early pregnancy, gestational weight gain, and risk of autism spectrum disorders: Results from a Swedish total population and discordant sibling study. *International Journal of Epidemiology*, 44(3), 870–883. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv081>
- Gareau, M. G., Wine, E., Rodrigues, D. M., Cho, J. H., Whary, M. T., Philpott, D. J., Macqueen, G., & Sherman, P. M. (2011). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*, 60(3), 307–317. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.202515>
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberg, A., Hultman, C. M., Devlin, B., Roeder, K., & Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, 46(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/ng.3039>
- Geng, Z.-H., Zhu, Y., Li, Q.-L., Zhao, C., & Zhou, P.-H. (2022). Enteric Nervous System: The Bridge Between the Gut Microbiota and Neurological Disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 810483. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.810483>
- Genovese, A., & Butler, M. G. (2023). The Autism Spectrum: Behavioral, Psychiatric and Genetic Associations. *Genes*, 14(3), 677. <https://doi.org/10.3390/genes14030677>
- Gentile, S. (2014). Risks of neurobehavioral teratogenicity associated with prenatal exposure to valproate monotherapy: A systematic review with regulatory repercussions. *CNS Spectrums*, 19(4), 305–315. <https://doi.org/10.1017/S1092852913000990>
- Gerbe, F., & Jay, P. (2016). Intestinal tuft cells: Epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1353–1359. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.68>
- Gershon, M. D. (1999). The Enteric Nervous System: A Second Brain. *Hospital Practice*, 34(7), 31–52. <https://doi.org/10.3810/hp.1999.07.153>
- Gil, A., Rueda, R., Ozanne, S. E., van der Beek, E. M., van Loo-Bouwman, C., Schoemaker, M., Marinello, V., Venema, K., Stanton, C., Schelkle, B., Flourakis, M., & Edwards, C. A. (2020). Is there evidence for bacterial transfer via the placenta and any role in the colonization of the infant gut? – A systematic review. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(5), 493–507. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1800587>
- Glinert, A., Turjeman, S., Elliott, E., & Koren, O. (2022). Microbes, metabolites and (synaptic) malleability, oh my! The effect of the microbiome on synaptic plasticity. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 97(2), 582–599. <https://doi.org/10.1111/brv.12812>
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet (London, England)*, 371(9606), 75–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60074-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60074-4)

- Goldstein, A., Hofstra, R., & Burns, A. (2013). Building a brain in the gut: Development of the enteric nervous system. *Clinical Genetics*, 83(4), 307–316. <https://doi.org/10.1111/cge.12054>
- Golovina, E., Fadason, T., Lints, T. J., Walker, C., Vickers, M. H., & O'Sullivan, J. M. (2021). Understanding the impact of SNPs associated with autism spectrum disorder on biological pathways in the human fetal and adult cortex. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95447-z>
- Golubeva, A. V., Joyce, S. A., Moloney, G., Burokas, A., Sherwin, E., Arboleya, S., Flynn, I., Khochanskiy, D., Moya-Pérez, A., Peterson, V., Rea, K., Murphy, K., Makarova, O., Buravkov, S., Hyland, N. P., Stanton, C., Clarke, G., Gahan, C. G. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism. *EBioMedicine*, 24, 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.020>
- Gonzales, J., Le Berre-Scoul, C., Dariel, A., Bréhéret, P., Neunlist, M., & Boudin, H. (2020). Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity and is inversely associated with synapsin 1 expression in Hirschsprung disease. *Scientific Reports*, 10, 15119. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71865-3>
- Gonzales, J., Marchix, J., Aymeric, L., Le Berre-Scoul, C., Zoppi, J., Bordron, P., Burel, M., Davidovic, L., Richard, J.-R., Gaman, A., Lejuste, F., Brouillet, J. Z., Le Vacon, F., Chaffron, S., Leboyer, M., Boudin, H., & Neunlist, M. (2021). Fecal Supernatant from Adult with Autism Spectrum Disorder Alters Digestive Functions, Intestinal Epithelial Barrier, and Enteric Nervous System. *Microorganisms*, 9(8), 1723. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081723>
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Goodsir, J., & Wilson, G. (1842). History of a Case in Which a Fluid Periodically Ejected from the Stomach Contained Vegetable Organisms of an Undescribed Form. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 57(151), 430–443.
- Green, C. R., Mihic, A. M., Nikkel, S. M., Stade, B. C., Rasmussen, C., Munoz, D. P., & Reynolds, J. N. (2009). Executive function deficits in children with fetal alcohol spectrum disorders (FASD) measured using the Cambridge Neuropsychological Tests Automated Battery (CANTAB). *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 50(6), 688–697. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2008.01990.x>
- Greenwood, B., & Mantle, M. (1992). Mucin and protein release in the rabbit jejunum: Effects of bethanechol and vagal nerve stimulation. *Gastroenterology*, 103(2), 496–505. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)90839-g](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)90839-g)
- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 277–299. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105439>
- Gulbransen, B. D., & Sharkey, K. A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>

- Gunn, R. K., Huentelman, M. J., & Brown, R. E. (2011). Are Sema5a mutant mice a good model of autism? A behavioral analysis of sensory systems, emotionality and cognition. *Behavioural Brain Research*, 225(1), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.008>
- Guy, J., Gan, J., Selfridge, J., Cobb, S., & Bird, A. (2007). Reversal of Neurological Defects in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5815), 1143–1147. <https://doi.org/10.1126/science.1138389>
- Ha, S., Oh, D., Lee, S., Park, J., Ahn, J., Choi, S., & Cheon, K.-A. (2021). Altered Gut Microbiota in Korean Children with Autism Spectrum Disorders. *Nutrients*, 13(10), 3300. <https://doi.org/10.3390/nu13103300>
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L. A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J. K., & Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of General Psychiatry*, 68(11), 1095–1102. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76>
- Hansen, M. B. (2003). The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacology & Toxicology*, 92(3), 105–113. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.t01-1-920301.x>
- Hao, M. M., & Young, H. M. (2009). Development of enteric neuron diversity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(7), 1193–1210. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00813.x>
- Hao, M. M., Boesmans, W., Abbeel, V. V. den, Jennings, E. A., Bornstein, J. C., Young, H. M., & Berghe, P. V. (2011). Early Emergence of Neural Activity in the Developing Mouse Enteric Nervous System. *Journal of Neuroscience*, 31(43), 15352–15361. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3053-11.2011>
- Hao, M. M., Bornstein, J. C., Vanden Berghe, P., Lomax, A. E., Young, H. M., & Foong, J. P. P. (2013). The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system. *Developmental Biology*, 382(1), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.006>
- Haro, C., Rangel-Zúñiga, O. A., Alcalá-Díaz, J. F., Gómez-Delgado, F., Pérez-Martínez, P., Delgado-Lista, J., Quintana-Navarro, G. M., Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Tena-Sempere, M., Clemente, J. C., López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., & Camargo, A. (2016). Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PLoS One*, 11(5), e0154090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154090>
- Harris, J. (2018). Leo Kanner and autism: A 75-year perspective. *International Review of Psychiatry*, 30(1), 3–17. <https://doi.org/10.1080/09540261.2018.1455646>
- Harris, S. W., Hessler, D., Goodlin-Jones, B., Ferranti, J., Bacalman, S., Barbato, I., Tassone, F., Hagerman, P. J., Herman, H., & Hagerman, R. J. (2008). Autism profiles of males with fragile X syndrome. *American Journal of Mental Retardation: AJMR*, 113(6), 427–438. <https://doi.org/10.1352/2008.113:427-438>
- Harstad, E., Hanson, E., Brewster, S. J., DePillis, R., Milliken, A. L., Aberbach, G., Sideridis, G., & Barbaresi, W. J. (2023). Persistence of Autism Spectrum Disorder From Early Childhood Through School Age. *JAMA Pediatrics*. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2023.4003>
- Hayes, C. L., Dong, J., Galipeau, H. J., Jury, J., McCarville, J., Huang, X., Wang, X.-Y., Naidoo, A., Anbazhagan, A. N., Libertucci, J., Sheridan, C., Dudeja, P. K., Bowdish, D. M. E., Surette, M. G., &

- Verdu, E. F. (2018). Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32366-6>
- Hayot, G., Massonot, M., Keime, C., Faure, E., & Golzio, C. (2023). Loss of autism-candidate CHD8 perturbs neural crest development and intestinal homeostatic balance. *Life Science Alliance*, 6(1), e202201456. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201456>
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 3047–3052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- Hernandez, R. E., Galitan, L., Cameron, J., Goodwin, N., & Ramakrishnan, L. (2018). Delay of Initial Feeding of Zebrafish Larvae Until 8 Days Postfertilization Has No Impact on Survival or Growth Through the Juvenile Stage. *Zebrafish*, 15(5), 515–518. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1579>
- Hibberd, T. J., Zagorodnyuk, V. P., Spencer, N. J., & Brookes, S. J. H. (2012). Viscerofugal neurons recorded from guinea-pig colonic nerves after organ culture. *Neurogastroenterology & Motility*, 24(11), 1041–e548. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01979.x>
- Higashi, T., Watanabe, S., Tomaru, K., Yamazaki, W., Yoshizawa, K., Ogawa, S., Nagao, H., Minato, K., Maekawa, M., & Mano, N. (2017). Unconjugated bile acids in rat brain: Analytical method based on LC/ESI-MS/MS with chemical derivatization and estimation of their origin by comparison to serum levels. *Steroids*, 125, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.07.001>
- Hirst, G. D. S., Holman, M. E., & Spence, I. (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *The Journal of Physiology*, 236(2), 303–326.
- Holiga, Š., Hipp, J. F., Chatham, C. H., Garces, P., Spooren, W., D’Ardhuy, X. L., Bertolino, A., Bouquet, C., Buitelaar, J. K., Bours, C., Rausch, A., Oldehinkel, M., Bouvard, M., Amestoy, A., Caralp, M., Gueguen, S., Ly-Le Moal, M., Houenou, J., Beckmann, C. F., ... Dukart, J. (2019). Patients with autism spectrum disorders display reproducible functional connectivity alterations. *Science Translational Medicine*, 11(481), eaat9223. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat9223>
- Holingue, C., Newill, C., Lee, L.-C., Pasricha, P. J., & Daniele Fallin, M. (2018). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 11(1), 24–36. <https://doi.org/10.1002/aur.1854>
- Horev, G., Ellegood, J., Lerch, J., Son, Y.-E., Muthuswamy, L., Vogel, H., Krieger, A., Buja, A., Henkelman, M., Wigler, M., & Mills, A. (2011). Dosage-Dependent Phenotypes in Models of 16p11.2 Lesions Found in Autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17076–17081. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114042108>
- Hosie, S., Ellis, M., Swaminathan, M., Ramalhosa, F., Seger, G. O., Balasuriya, G. K., Gillberg, C., Råstam, M., Churilov, L., McKeown, S. J., Yalcinkaya, N., Urvil, P., Savidge, T., Bell, C. A., Bodin, O., Wood, J., Franks, A. E., Bornstein, J. C., & Hill-Yardin, E. L. (2019). Gastrointestinal dysfunction in patients and mice expressing the autism-associated R451C mutation in neuroligin-3. *Autism Research*, 12(7), 1043–1056. <https://doi.org/10.1002/aur.2127>
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Gaid, A., & Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce

- megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, 79(7), 1267–1276.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90017-5)
- Hoyle, C. H., & Burnstock, G. (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *Journal of Anatomy*, 166, 7–22.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Codelli, J. A., Chow, J., Reisman, S. E., Petrosino, J. F., Patterson, P. H., & Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell*, 155(7), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
- Huang, C., Wang, J., Hu, W., Wang, C., Lu, X., Tong, L., Wu, F., & Zhang, W. (2016). Identification of functional farnesoid X receptors in brain neurons. *FEBS Letters*, 590(18), 3233–3242.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12373>
- Huang, F., Wang, T., Lan, Y., Yang, L., Pan, W., Zhu, Y., Lv, B., Wei, Y., Shi, H., Wu, H., Zhang, B., Wang, J., Duan, X., Hu, Z., & Wu, X. (2015). Deletion of mouse FXR gene disturbs multiple neurotransmitter systems and alters neurobehavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2015.00070>
- Huang, H.-L., Xu, H.-M., Liu, Y.-D., Shou, D.-W., Chen, H.-T., Nie, Y.-Q., Li, Y.-Q., & Zhou, Y.-J. (2022). First Application of Fecal Microbiota Transplantation in Adult Asperger Syndrome With Digestive Symptoms—A Case Report. *Frontiers in Psychiatry*, 13.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2022.695481>
- Hunter, J., Rivero-Arias, O., Angelov, A., Kim, E., Fotheringham, I., & Leal, J. (2014). Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 164A(7), 1648–1658. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36511>
- Hurley, M. J., Bates, R., Macnaughtan, J., & Schapira, A. H. V. (2022). Bile acids and neurological disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 240, 108311.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108311>
- Husebye, E., Hellström, P. M., Sundler, F., Chen, J., & Midtvedt, T. (2001). Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(3), G368–380.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.3.G368>
- Hutchins, E. J., Kunttas, E., Piacentino, M. L., Howard, A. G. A., Bronner, M. E., & Uribe, R. A. (2018). Migration and diversification of the vagal neural crest. *Developmental Biology*, 444, S98–S109.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.004>
- Hviid, A., Hansen, J. V., Frisch, M., & Melbye, M. (2019). Measles, Mumps, Rubella Vaccination and Autism. *Annals of Internal Medicine*, 170(8), 513–520. <https://doi.org/10.7326/M18-2101>
- Hyman, S. L., Levy, S. E., Myers, S. M., & COUNCIL ON CHILDREN WITH DISABILITIES, SECTION ON DEVELOPMENTAL AND BEHAVIORAL PEDIATRICS. (2020). Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*, 145(1), e20193447.
<https://doi.org/10.1542/peds.2019-3447>
- Ibrahim, S. H., Voigt, R. G., Katusic, S. K., Weaver, A. L., & Barbaresi, W. J. (2009). Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: A population-based study. *Pediatrics*, 124(2), 680–686. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-2933>

- Iglesias-Vázquez, L., Van Ginkel Riba, G., Arija, V., & Canals, J. (2020). Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, *12*(3), 792. <https://doi.org/10.3390/nu12030792>
- Iossifov, I., O’Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H. A., Witherspoon, K. T., Vives, L., Patterson, K. E., Smith, J. D., Paepier, B., Nickerson, D. A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L. E., Mandell, J. D., Mane, S. M., Murtha, M. T., ... Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, *515*(7526), 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>
- Jacquemont, S., Coe, B. P., Hersch, M., Duyzend, M. H., Krumm, N., Bergmann, S., Beckmann, J. S., Rosenfeld, J. A., & Eichler, E. E. (2014). A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders. *American Journal of Human Genetics*, *94*(3), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.001>
- Jakobsson, H. E., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G. C., & Johansson, M. E. V. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Reports*, *16*(2), 164–177. <https://doi.org/10.15252/embr.201439263>
- James, D. M., Kozol, R. A., Kajiwara, Y., Wahl, A. L., Storrs, E. C., Buxbaum, J. D., Klein, M., Moshiree, B., & Dallman, J. E. (2019). Intestinal dysmotility in a zebrafish (*Danio rerio*) shank3a;shank3b mutant model of autism. *Molecular Autism*, *10*, 3. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0250-4>
- Jandhyala, S. M. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(29), 8787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., & Jansson, J. K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal*, *1*(1), 56–66. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.3>
- Ji, S.-I., Park, H., Yoon, S. A., & Hong, S.-B. (2023). A Validation Study of the CARS-2 Compared With the ADOS-2 in the Diagnosis of Autism Spectrum Disorder: A Suggestion for Cutoff Scores. *Journal of the Korean Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *34*(1), 45–50. <https://doi.org/10.5765/jkacap.220027>
- Jiang, H., Xu, L., Shao, L., Xia, R., Yu, Z., Ling, Z., Yang, F., Deng, M., & Ruan, B. (2016). Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, *58*, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.005>
- Johnson, E. L., Heaver, S. L., Walters, W. A., & Ley, R. E. (2017). Microbiome and metabolic disease: Revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *95*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1492-2>
- Jongbloets, B. C., & Pasterkamp, R. J. (2014). Semaphorin signalling during development. *Development*, *141*(17), 3292–3297. <https://doi.org/10.1242/dev.105544>
- Joseph, T. P., Zhou, F., Sai, L. Y., Chen, H., Lin, S. L., & Schachner, M. (2022). Duloxetine ameliorates valproic acid-induced hyperactivity, anxiety-like behavior, and social interaction deficits in zebrafish. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, *15*(1), 27–41. <https://doi.org/10.1002/aur.2620>

- Kaiko, G. E., Ryu, S. H., Koues, O. I., Collins, P. L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E. J., Pearce, E. L., Oltz, E. M., & Stappenbeck, T. S. (2016). The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell*, *165*(7), 1708–1720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.018>
- Kalsner, L., & Chamberlain, S. J. (2015). Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 duplication syndromes. *Pediatric Clinics of North America*, *62*(3), 587–606. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.03.004>
- Kang, C., Zhang, Y., Zhu, X., Liu, K., Wang, X., Chen, M., Wang, J., Chen, H., Hui, S., Huang, L., Zhang, Q., Zhu, J., Wang, B., & Mi, M. (2016). Healthy Subjects Differentially Respond to Dietary Capsaicin Correlating with Specific Gut Enterotypes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *101*(12), 4681–4689. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2786>
- Kang, D.-W., Adams, J. B., Coleman, D. M., Pollard, E. L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2019). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific Reports*, *9*(1), 5821. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>
- Kang, D.-W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., Khoruts, A., Geis, E., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Pollard, E. L., Roux, S., Sadowsky, M. J., Lipson, K. S., Sullivan, M. B., Caporaso, J. G., & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome*, *5*(1). Scopus. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7>
- Kang, D.-W., Ilhan, Z. E., Isern, N. G., Hoyt, D. W., Howsmon, D. P., Shaffer, M., Lozupone, C. A., Hahn, J., Adams, J. B., & Krajmalnik-Brown, R. (2018). Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*, *49*, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.007>
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, *2*, 217–250.
- Kantor, D. B., Chivatakarn, O., Peer, K. L., Oster, S. F., Inatani, M., Hansen, M. J., Flanagan, J. G., Yamaguchi, Y., Sretavan, D. W., Giger, R. J., & Kolodkin, A. L. (2004). Semaphorin 5A Is a Bifunctional Axon Guidance Cue Regulated by Heparan and Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Neuron*, *44*(6), 961–975. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.002>
- Karimi, P., Kamali, E., Mousavi, S., & Karahmadi, M. (2017). Environmental factors influencing the risk of autism. *Journal of Research in Medical Sciences*, *22*(1), 27. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.200272>
- Katayama, Y., Nishiyama, M., Shoji, H., Ohkawa, Y., Kawamura, A., Sato, T., Suyama, M., Takumi, T., Miyakawa, T., & Nakayama, K. I. (2016). CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature*, *537*(7622), 675–679. <https://doi.org/10.1038/nature19357>
- Keitel, V., Görg, B., Bidmon, H. J., Zemtsova, I., Spomer, L., Zilles, K., & Häussinger, D. (2010). The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. *Glia*, *58*(15), 1794–1805. <https://doi.org/10.1002/glia.21049>
- Kim, J. Y., Whon, T. W., Lim, M. Y., Kim, Y. B., Kim, N., Kwon, M.-S., Kim, J., Lee, S. H., Choi, H.-J., Nam, I.-H., Chung, W.-H., Kim, J.-H., Bae, J.-W., Roh, S. W., & Nam, Y.-D. (2020). The human gut archaeome: Identification of diverse haloarchaea in Korean subjects. *Microbiome*, *8*(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00894-x>

- Kim, J.-W., Choi, C. S., Kim, K. C., Park, J. H., Seung, H., Joo, S. H., Yang, S. M., Shin, C. Y., & Park, S. H. (2013). Gastrointestinal Tract Abnormalities Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rat Offspring. *Toxicological Research*, 29(3), 173–179. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.3.173>
- Kim, N. H., Park, J. H., Park, J., & Joung, Y.-H. (2017). The Effect of Deoxycholic Acid on Secretion and Motility in the Rat and Guinea Pig Large Intestine. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23(4), 606–615. <https://doi.org/10.5056/jnm16201>
- Kim, Y. S., Unno, T., Kim, B.-Y., & Park, M.-S. (2020). Sex Differences in Gut Microbiota. *The World Journal of Men's Health*, 38(1), 48–60. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190009>
- Kimball, B. C., & Mulholland, M. W. (1995). Neuroligands evoke calcium signaling in cultured myenteric neurons. *Surgery*, 118(2), 162–170. [https://doi.org/10.1016/S0039-6060\(05\)80319-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6060(05)80319-8)
- Kirsten, T. B., Taricano, M., Maiorka, P. C., Palermo-Neto, J., & Bernardi, M. M. (2010). Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation*, 17(4), 240–251. <https://doi.org/10.1159/000290040>
- Kolmeder, C. A., & de Vos, W. M. (2014). Metaproteomics of our microbiome—Developing insight in function and activity in man and model systems. *Journal of Proteomics*, 97, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.018>
- Kong, Q., Tian, P., Zhao, J., Zhang, H., Wang, G., & Chen, W. (2021). The autistic-like behaviors development during weaning and sexual maturation in VPA-induced autistic-like rats is accompanied by gut microbiota dysbiosis. *PeerJ*, 9, e11103. <https://doi.org/10.7717/peerj.11103>
- Kong, X.-J., Liu, J., Li, J., Kwong, K., Koh, M., Sukijthamapan, P., Guo, J. J., Sun, Z. J., & Song, Y. (2020). Probiotics and oxytocin nasal spray as neuro-social-behavioral interventions for patients with autism spectrum disorders: A pilot randomized controlled trial protocol. *Pilot and Feasibility Studies*, 6, 20. <https://doi.org/10.1186/s40814-020-0557-8>
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2567–2572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409727102>
- Korteniemi, J., Karlsson, L., & Aatsinki, A. (2023). Systematic review: Autism spectrum disorder and the gut microbiota. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 148(3), 242–254. <https://doi.org/10.1111/acps.13587>
- Kozik, A. J., Nakatsu, C. H., Chun, H., & Jones-Hall, Y. L. (2017). Age, sex, and TNF associated differences in the gut microbiota of mice and their impact on acute TNBS colitis. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.11.014>
- Krakowiak, P., Walker, C. K., Bremer, A. A., Baker, A. S., Ozonoff, S., Hansen, R. L., & Hertz-Picciotto, I. (2012). Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics*, 129(5), e1121-1128. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2583>
- Kratsman, N., Getselter, D., & Elliott, E. (2016). Sodium butyrate attenuates social behavior deficits and modifies the transcription of inhibitory/excitatory genes in the frontal cortex of an autism model. *Neuropharmacology*, 102, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.003>

- Kretz, P. F., Wagner, C., Mikhaleva, A., Montillot, C., Hugel, S., Morella, I., Kannan, M., Fischer, M.-C., Milhau, M., Yalcin, I., Brambilla, R., Selloum, M., Herault, Y., Reymond, A., Collins, S. C., & Yalcin, B. (2023b). Dissecting the autism-associated 16p11.2 locus identifies multiple drivers in neuroanatomical phenotypes and unveils a male-specific role for the major vault protein. *Genome Biology*, 24(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-03092-8>
- Krych, L., Hansen, C. H. F., Hansen, A. K., Berg, F. W. J. van den, & Nielsen, D. S. (2013). Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta-Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View towards the Human Gut Microbiome. *PLOS ONE*, 8(5), e62578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062578>
- Kunze, W. A., Mao, Y.-K., Wang, B., Huizinga, J. D., Ma, X., Forsythe, P., & Bienenstock, J. (2009). *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8B), 2261–2270. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00686.x>
- Lai, M.-C., & Baron-Cohen, S. (2015). Identifying the lost generation of adults with autism spectrum conditions. *The Lancet Psychiatry*, 2(11), 1013–1027. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00277-1](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00277-1)
- Lai, M.-C., Lombardo, M. V., & Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *The Lancet*, 383(9920), 896–910. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61539-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1)
- Lake, J. I., & Heuckeroth, R. O. (2013). Enteric nervous system development: Migration, differentiation, and disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(1), G1–G24. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00452.2012>
- Landgren, M., Svensson, L., Strömland, K., & Andersson Grönlund, M. (2010). Prenatal Alcohol Exposure and Neurodevelopmental Disorders in Children Adopted From Eastern Europe. *Pediatrics*, 125(5), e1178–e1185. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-0712>
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 6955–6959.
- Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmstrøm, K., Rajilic, M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M., Collins, M. D., Thiel, R., Namsolleck, P., Blaut, M., & Doré, J. (2005). Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4153–4155. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4153-4155.2005>
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Garup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., ... Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>
- Le Couteur, A., Rutter, M., Lord, C., Rios, P., Robertson, S., Holdgrafer, M., & McLennan, J. (1989). Autism diagnostic interview: A standardized investigator-based instrument. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 19(3), 363–387. <https://doi.org/10.1007/BF02212936>
- Le Dréan, M. E. L., Marchix, J., Neunlist, M., & Boudin, H. (2021). *Sept minutes pour comprendre le microbiote intestinal et son impact sur la santé*. 28. HépatGastro & Oncologie Digestive, DOI: 10.1684/hpg.2021.2172

- Lee, B. K., Magnusson, C., Gardner, R. M., Blomström, Å., Newschaffer, C. J., Burstyn, I., Karlsson, H., & Dalman, C. (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 44, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.001>
- Leembruggen, A. J. L., Balasuriya, G. K., Zhang, J., Schokman, S., Swiderski, K., Bornstein, J. C., Nithianantharajah, J., & Hill-Yardin, E. L. (2020). Colonic dilation and altered ex vivo gastrointestinal motility in the neurologgin-3 knockout mouse. *Autism Research*, 13(5), 691–701. <https://doi.org/10.1002/aur.2109>
- Leo, A., De Caro, C., Mainardi, P., Tallarico, M., Nesci, V., Marascio, N., Striano, P., Russo, E., Constanti, A., De Sarro, G., & Citraro, R. (2021). Increased efficacy of combining prebiotic and postbiotic in mouse models relevant to autism and depression. *Neuropharmacology*, 198, 108782. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108782>
- Levy, M. A., Relator, R., McConkey, H., Pranckeviciene, E., Kerkhof, J., Barat-Houari, M., Bargiacchi, S., Biamino, E., Palomares Bralo, M., Cappuccio, G., Ciolfi, A., Clarke, A., DuPont, B. R., Elting, M. W., Faivre, L., Fee, T., Ferilli, M., Fletcher, R. S., Cherick, F., ... Sadikovic, B. (2022). Functional correlation of genome-wide DNA methylation profiles in genetic neurodevelopmental disorders. *Human Mutation*, 43(11), 1609–1628. <https://doi.org/10.1002/humu.24446>
- Lewandowska-Pietruszka, Z., Figlerowicz, M., & Mazur-Melewska, K. (2022). The History of the Intestinal Microbiota and the Gut-Brain Axis. *Pathogens*, 11(12), 1540. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121540>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>
- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Zhang, M., Wei, H., Chen, Y., Lu, H., Zuo, J., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., Xiao, C., Smith, L. M., ... Zhao, L. (2008). Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2117–2122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712038105>
- Li, N., Chen, H., Cheng, Y., Xu, F., Ruan, G., Ying, S., Tang, W., Chen, L., Chen, M., Lv, L., Ping, Y., Chen, D., & Wei, Y. (2021). Fecal Microbiota Transplantation Relieves Gastrointestinal and Autism Symptoms by Improving the Gut Microbiota in an Open-Label Study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 759435. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.759435>
- Li, Z., Zhu, Y.-X., Gu, L.-J., & Cheng, Y. (2021). Understanding autism spectrum disorders with animal models: Applications, insights, and perspectives. *Zoological Research*, 42(6), 800–824. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.251>
- Liang, C., Tseng, H.-C., Chen, H.-M., Wang, W.-C., Chiu, C.-M., Chang, J.-Y., Lu, K.-Y., Weng, S.-L., Chang, T.-H., Chang, C.-H., Weng, C.-T., Wang, H.-M., & Huang, H.-D. (2017). Diversity and enterotype in gut bacterial community of adults in Taiwan. *BMC Genomics*, 18. Scopus. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3261-6>
- Lim, J. S., Lim, M. Y., Choi, Y., & Ko, G. (2017). Modeling environmental risk factors of autism in mice induces IBD-related gut microbial dysbiosis and hyperserotonemia. *Molecular Brain*, 10(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0292-0>

- Lin, J., de Rezende, V. L., de Aguiar da Costa, M., de Oliveira, J., & Gonçalves, C. L. (2023). Cholesterol metabolism pathway in autism spectrum disorder: From animal models to clinical observations. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 223, 173522. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2023.173522>
- Liu, C., & Yang, J. (2022). Enteric Glial Cells in Immunological Disorders of the Gut. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2022.895871>
- Liu, F., Horton-Sparks, K., Hull, V., Li, R. W., & Martínez-Cerdeño, V. (2018). The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism. *Molecular Autism*, 9(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0251-3>
- Liu, J., Liu, C., Gao, Z., Zhou, L., Gao, J., Luo, Y., Liu, T., & Fan, X. (2022). GW4064 Alters Gut Microbiota Composition and Counteracts Autism-Associated Behaviors in BTBR T+tf/J Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. Scopus. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.911259>
- Liu, J., Wan, G., Huang, M., Agyapong, G., Zou, T., Zhang, X., Liu, Y.-W., Song, Y., Tsai, Y.-C., & Kong, X. (2019). Probiotic Therapy for Treating Behavioral and Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review of Clinical Trials. *Current Medical Science*, 39(2), 173–184. <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2016-4>
- Liu, Y.-W., Liong, M. T., Chung, Y.-C. E., Huang, H.-Y., Peng, W.-S., Cheng, Y.-F., Lin, Y.-S., Wu, Y.-Y., & Tsai, Y.-C. (2019). Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on Children with Autism Spectrum Disorder in Taiwan: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, 11(4), 820. <https://doi.org/10.3390/nu11040820>
- Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12(5), 315–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Llewellyn-Smith, I. J., Costa, M., & Furness, J. B. (1985). Light and electron microscopic immunocytochemistry of the same nerves from whole mount preparations. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(9), 857–866. <https://doi.org/10.1177/33.9.3926868>
- Lomax, A. E., Bertrand, P. P., & Furness, J. B. (2001). Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon. *Neuroscience*, 103(1), 245–255. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00545-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00545-5)
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D490-495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 56(6), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *Lancet (London, England)*, 392(10146), 508–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
- Lord, C., Risi, S., Lambrecht, L., Cook, Jr., E. H., Leventhal, B. L., DiLavore, P. C., Pickles, A., & Rutter, M. (2000). The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and

- communication deficits associated with the spectrum of autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 30(3), 205–223. <https://doi.org/10.1023/A:1005592401947>
- Lord, C., Rutter, M., & Le Couteur, A. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: A revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 24(5), 659–685. <https://doi.org/10.1007/BF02172145>
- Louca, S., Mazel, F., Doebeli, M., & Parfrey, L. W. (2019). A census-based estimate of Earth's bacterial and archaeal diversity. *PLOS Biology*, 17(2), e3000106. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000106>
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Lund, M. L., Egerod, K. L., Engelstoft, M. S., Dmytriyeva, O., Theodorsson, E., Patel, B. A., & Schwartz, T. W. (2018). Enterochromaffin 5-HT cells—A major target for GLP-1 and gut microbial metabolites. *Molecular Metabolism*, 11, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.03.004>
- Ma, B., Liang, J., Dai, M., Wang, J., Luo, J., Zhang, Z., & Jing, J. (2019). Altered Gut Microbiota in Chinese Children With Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00040>
- MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K.-P., & Cain, D. P. (2011). Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.005>
- Madra, M., Ringel, R., & Margolis, K. G. (2020). Gastrointestinal Issues and Autism Spectrum Disorder. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 29(3), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2020.02.005>
- Maenner, M. J. (2023). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR. Surveillance Summaries*, 72. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7202a1>
- Mai, F. M. (1988). Beaumont's contribution to gastric psychophysiology: A reappraisal. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne De Psychiatrie*, 33(7), 650–653. <https://doi.org/10.1177/070674378803300715>
- Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., & Shan, B. (1999). Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science*, 284(5418), 1362–1365. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1362>
- Malkova, N. V., Yu, C. Z., Hsiao, E. Y., Moore, M. J., & Patterson, P. H. (2012). Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.011>
- Manca, C., Shen, M., Boubertakh, B., Martin, C., Flamand, N., Silvestri, C., & Di Marzo, V. (2020). Alterations of brain endocannabinoidome signaling in germ-free mice. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(12), 158786. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158786>

- Mangiola, F., Nicoletti, A., Gasbarrini, A., & Ponziani, F. R. (2018). Gut microbiota and aging. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(21), 7404–7413. https://doi.org/10.26355/eurev_201811_16280
- Mano, N., Goto, T., Uchida, M., Nishimura, K., Ando, M., Kobayashi, N., & Goto, J. (2004). Presence of protein-bound unconjugated bile acids in the cytoplasmic fraction of rat brain. *Journal of Lipid Research*, 45(2), 295–300. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300369-JLR200>
- Manor, O., Dai, C. L., Kornilov, S. A., Smith, B., Price, N. D., Lovejoy, J. C., Gibbons, S. M., & Magis, A. T. (2020). Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18871-1>
- Margolis, K. G., Cryan, J. F., & Mayer, E. A. (2021). The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology*, 160(5), 1486–1501. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.066>
- Margolis, K. G., Li, Z., Stevanovic, K., Saurman, V., Israelyan, N., Anderson, G. M., Snyder, I., Veenstra-VanderWeele, J., Blakely, R. D., & Gershon, M. D. (2016). Serotonin transporter variant drives preventable gastrointestinal abnormalities in development and function. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(6), 2221–2235. <https://doi.org/10.1172/JCI84877>
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., & Furet, J.-P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9(1), 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>
- Marí-Bauset, S., Zazpe, I., Mari-Sanchis, A., Llopis-González, A., & Morales-Suárez-Varela, M. (2014). Food selectivity in autism spectrum disorders: A systematic review. *Journal of Child Neurology*, 29(11), 1554–1561. <https://doi.org/10.1177/0883073813498821>
- Markle, J. G. M., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., & Danska, J. S. (2013). Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6123), 1084–1088. <https://doi.org/10.1126/science.1233521>
- Marlborough, M., Welham, A., Jones, C., Reckless, S., & Moss, J. (2021). Autism spectrum disorder in females with fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis of prevalence. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 13, 28. <https://doi.org/10.1186/s11689-021-09362-5>
- Martinez-Guryn, K., Leone, V., & Chang, E. B. (2019). Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome. *Cell Host & Microbe*, 26(3), 314–324. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.011>
- Martinot, E., Sèdes, L., Baptissart, M., Lobaccaro, J.-M., Caira, F., Beaudoin, C., & Volle, D. H. (2017). Bile acids and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine*, 56, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.006>
- Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H., & Tanaka, K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), 714–719. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02550-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02550-0)
- Masini, E., Loi, E., Vega-Benedetti, A. F., Carta, M., Doneddu, G., Fadda, R., & Zavattari, P. (2020). An Overview of the Main Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Involved in Autism

- Spectrum Disorder Focusing on Synaptic Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8290. <https://doi.org/10.3390/ijms21218290>
- Masuda, T., Sakuma, C., Yaginuma, H., & Taniguchi, M. (2014). Attractive and permissive activities of semaphorin 5A toward dorsal root ganglion axons in higher vertebrate embryos. *Cell Adhesion & Migration*, 8(6), 603–606. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972770>
- Matsuoka, R. L., Chivatakarn, O., Badea, T. C., Samuels, I. S., Cahill, H., Katayama, K., Kumar, S. R., Suto, F., Chédotal, A., Peachey, N. S., Nathans, J., Yoshida, Y., Giger, R. J., & Kolodkin, A. L. (2011). Class 5 Transmembrane Semaphorins Control Selective Mammalian Retinal Lamination and Function. *Neuron*, 71(3), 460–473. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.009>
- Mattson, S. N., & Riley, E. P. (1998). A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22(2), 279–294. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb03651.x>
- Mawe, G. M. (2015). Colitis-induced neuroplasticity disrupts motility in the inflamed and post-inflamed colon. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 949–955. <https://doi.org/10.1172/JCI76306>
- Mawe, G. M., Strong, D. S., & Sharkey, K. A. (2009). Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed and post-inflamed gut. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 21(5), 481–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01291.x>
- Mazefsky, C. A., McPartland, J. C., Gastgeb, H. Z., & Minshew, N. J. (2013). Comparability of DSM-IV and DSM-5 ASD Research Samples. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43(5), 1236–1242. <https://doi.org/10.1007/s10803-012-1665-y>
- McDuffie, A., Thurman, A. J., Hagerman, R. J., & Abbeduto, L. (2015). Symptoms of Autism in Males with Fragile X Syndrome: A Comparison to Nonsyndromic ASD using Current ADI-R Scores. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 45(7), 1925–1937. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-2013-6>
- McFarlane, H. G., Kusek, G. K., Yang, M., Phoenix, J. L., Bolivar, V. J., & Crawley, J. N. (2008). Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 7(2), 152–163. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00330.x>
- McGee, J. S., & Huttenhower, C. (2021). Of mice and men and women: Sexual dimorphism of the gut microbiome. *International Journal of Women's Dermatology*, 7(5Part A), 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2021.10.007>
- McMillin, M., Frampton, G., Quinn, M., Ashfaq, S., de los Santos, M., Grant, S., & DeMorrow, S. (2016). Bile Acid Signaling Is Involved in the Neurological Decline in a Murine Model of Acute Liver Failure. *The American Journal of Pathology*, 186(2), 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.10.005>
- McVey Neufeld, K. A., Mao, Y. K., Bienenstock, J., Foster, J. A., & Kunze, W. A. (2013). The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse. *Neurogastroenterology and Motility*, 25(2), 183–e88. <https://doi.org/10.1111/nmo.12049>
- McVey Neufeld, K. A., Perez-Burgos, A., Mao, Y. K., Bienenstock, J., & Kunze, W. A. (2015). The gut microbiome restores intrinsic and extrinsic nerve function in germ-free mice accompanied by

- changes in calbindin. *Neurogastroenterology & Motility*, 27(5), 627–636.
<https://doi.org/10.1111/nmo.12534>
- Meissner, G. (1857). Über die nerven der Darmwand. *Z. Für Ration. Med.* 364–366.
- Melin, M., Carlsson, B., Anckarsater, H., Rastam, M., Betancur, C., Isaksson, A., Gillberg, C., & Dahl, N. (2006). Constitutional Downregulation of *SEMA5A* Expression in Autism. *Neuropsychobiology*, 54(1), 64–69. <https://doi.org/10.1159/000096040>
- Messenger, J. P., Bornstein, J. C., & Furness, J. B. (1994). Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of the guinea-pig. *Neuroscience*, 60(1), 227–244. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90217-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90217-8)
- Metchnikoff, E., & Mitchell, P. C. (Peter C. (1908). *The prolongation of life; optimistic studies*. New York & London : G.P. Putnam's Sons. <http://archive.org/details/prolongationofli00metciala>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 81(4), e00036-17.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>
- Mitsui, R., Ono, S., Karaki, S., & Kuwahara, A. (2005). Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. *Neurogastroenterology & Motility*, 17(4), 585–594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00669.x>
- Mittal, R., Debs, L. H., Patel, A. P., Nguyen, D., Patel, K., O'Connor, G., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A. A., Deo, S. K., Daunert, S., & Liu, X. Z. (2017). Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. *Journal of Cellular Physiology*, 232(9), 2359–2372.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25518>
- Mizuno, Y., Nakanishi, Y., & Kumanogoh, A. (2023). Pathophysiological functions of semaphorins in the sympathetic nervous system. *Inflammation and Regeneration*, 43(1), 30.
<https://doi.org/10.1186/s41232-023-00281-7>
- Moretti, P., Bouwknecht, J. A., Teague, R., Paylor, R., & Zoghbi, H. Y. (2005). Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Human Molecular Genetics*, 14(2), 205–220. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi016>
- Mosca-Boidron, A.-L., Gueneau, L., Huguet, G., Goldenberg, A., Henry, C., Gigot, N., Pallesi-Pocachard, E., Falace, A., Duplomb, L., Thevenon, J., Duffourd, Y., St-Onge, J., Chambon, P., Rivière, J.-B., Thauvin-Robinet, C., Callier, P., Marle, N., Payet, M., Ragon, C., ... Bourgeron, T. (2016). A de novo microdeletion of *SEMA5A* in a boy with autism spectrum disorder and intellectual disability. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 24(6), 838–843.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.211>
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M. C., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H.-J. F., Doré, J., & Blaut, M. (2006). Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: A cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1027–1033.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006>

- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.006>
- Neefs, J.-M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., & De Wachter, R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Research*, 21(13), 3025–3049. <https://doi.org/10.1093/nar/21.13.3025>
- Neier, K., Grant, T. E., Palmer, R. L., Chappell, D., Hakam, S. M., Yasui, K. M., Rolston, M., Settles, M. L., Hunter, S. S., Madany, A., Ashwood, P., Durbin-Johnson, B., LaSalle, J. M., & Yasui, D. H. (2021). Sex disparate gut microbiome and metabolome perturbations precede disease progression in a mouse model of Rett syndrome. *Communications Biology*, 4, 1408. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02915-3>
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., & Foster, J. A. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(3), 255–264, e119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>
- Neunlist, M., & Schemann, M. (2014). Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *The Journal of Physiology*, 592(Pt 14), 2959–2965. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272948>
- Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C. L., Galmiche, J.-P., & Jarry, A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(5), G1028-1036. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00066.2003>
- Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M. M., Derkinderen, P., Des Varannes, S. B., & Rolli-Derkinderen, M. (2013). The digestive neuronal–glial–epithelial unit: A new actor in gut health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(2), 90–100. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.221>
- Newell, C., Bomhof, M. R., Reimer, R. A., Hittel, D. S., Rho, J. M., & Shearer, J. (2016). Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 7(1). Scopus. <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0099-3>
- Nguyen, D. K., & Disteche, C. M. (2006). High expression of the mammalian X chromosome in brain. *Brain Research*, 1126(1), 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.053>
- Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., & White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4>
- Nicoletti, C. (2000). Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut*, 47(5), 735–739. <https://doi.org/10.1136/gut.47.5.735>
- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D. F., Young, H. M., & Enomoto, H. (2012). Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nature Neuroscience*, 15(9), 1211–1218. <https://doi.org/10.1038/nn.3184>

- Nkamga, V. D., Henrissat, B., & Drancourt, M. (2017). Archaea: Essential inhabitants of the human digestive microbiota. *Human Microbiome Journal*, 3, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.humic.2016.11.005>
- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32–48.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- O'Roak, B. J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J. D., Stanaway, I. B., Phelps, I. G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., Munson, J., Hiatt, J. B., Turner, E. H., Levy, R., O'Day, D. R., Krumm, N., Coe, B. P., Martin, B. K., Borenstein, E., ... Shendure, J. (2012). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6114), 1619–1622. <https://doi.org/10.1126/science.1227764>
- O'Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernet, B., Malig, M., Baker, C., Reilly, B., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., ... Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485(7397), 246–250.
<https://doi.org/10.1038/nature10989>
- O'Toole, P. W., & Jeffery, I. B. (2015). Gut microbiota and aging. *Science*, 350(6265), 1214–1215.
<https://doi.org/10.1126/science.aac8469>
- Obata, Y., Castaño, Á., Boeing, S., Bon-Frauches, A. C., Fung, C., Fallesen, T., de Agüero, M. G., Yilmaz, B., Lopes, R., Huseynova, A., Horswell, S., Maradana, M. R., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., Murray, A. J., Stockinger, B., Macpherson, A. J., & Pachnis, V. (2020). Neuronal programming by microbiota regulates intestinal physiology. *Nature*, 578(7794), 284–289.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-1975-8>
- Oh, D., & Cheon, K.-A. (2020a). Alteration of Gut Microbiota in Autism Spectrum Disorder: An Overview. *Journal of the Korean Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 31(3), 131–145.
<https://doi.org/10.5765/jkacap.190039>
- Ojala, T., Häkkinen, A.-E., Kankuri, E., & Kankainen, M. (2023). Current concepts, advances, and challenges in deciphering the human microbiota with metatranscriptomics. *Trends in Genetics*, 39(9), 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.05.004>
- Okoye, C., Obialo-Ibeawuchi, C. M., Obajeun, O. A., Sarwar, S., Tawfik, C., Waleed, M. S., Wasim, A. U., Mohamoud, I., Afolayan, A. Y., & Mbaezue, R. N. (n.d.). Early Diagnosis of Autism Spectrum Disorder: A Review and Analysis of the Risks and Benefits. *Cureus*, 15(8), e43226.
<https://doi.org/10.7759/cureus.43226>
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B. W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T. A., & Lusi, A. J. (2016). Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes*, 7(4), 313–322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>
- Ouldin, K., Samri, I., Bouguenouch, L., Hamdaoui, H., Otmani, I. E., Hbib, M., Chaouki, S., & Hida, M. (2012). Le syndrome de Cri du Chat: A propos d'une observation. *The Pan African Medical Journal*, 11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3283019/>
- Ousley, O., Evans, A. N., Fernandez-Carriba, S., Smearman, E. L., Rockers, K., Morrier, M. J., Evans, D. W., Coleman, K., & Cubells, J. (2017). Examining the Overlap between Autism Spectrum Disorder

- and 22q11.2 Deletion Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1071. <https://doi.org/10.3390/ijms18051071>
- Özcan, E., & Hsiao, E. Y. (2022). Are changes in the gut microbiome a contributor or consequence of autism—Why not both? *Cell Reports Medicine*, 3(1), 100505. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100505>
- Ozonoff, S., Young, G. S., Carter, A., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Carver, L. J., Constantino, J. N., Dobkins, K., Hutman, T., Iverson, J. M., Landa, R., Rogers, S. J., Sigman, M., & Stone, W. L. (2011). Recurrence risk for autism spectrum disorders: A Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*, 128(3), e488-495. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-2825>
- Pai, R., Tarnawski, A. S., & Tran, T. (2004). Deoxycholic Acid Activates β -Catenin Signaling Pathway and Increases Colon Cell Cancer Growth and Invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2156–2163. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-12-0894>
- Pan, X., Elliott, C. T., McGuinness, B., Passmore, P., Kehoe, P. G., Hölscher, C., McClean, P. L., Graham, S. F., & Green, B. D. (2017). Metabolomic Profiling of Bile Acids in Clinical and Experimental Samples of Alzheimer's Disease. *Metabolites*, 7(2), 28. <https://doi.org/10.3390/metabo7020028>
- Pan, Z.-Y., Zhong, H.-J., Huang, D.-N., Wu, L.-H., & He, X.-X. (2022). Beneficial Effects of Repeated Washed Microbiota Transplantation in Children With Autism. *Frontiers in Pediatrics*, 10, 928785. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.928785>
- Panzer, J. J., Romero, R., Greenberg, J. M., Winters, A. D., Galaz, J., Gomez-Lopez, N., & Theis, K. R. (2023). Is there a placental microbiota? A critical review and re-analysis of published placental microbiota datasets. *BMC Microbiology*, 23(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02764-6>
- Parathan, P., Wang, Y., Leembruggen, A. J., Bornstein, J. C., & Foong, J. P. (2020). The enteric nervous system undergoes significant chemical and synaptic maturation during adolescence in mice. *Developmental Biology*, 458(1), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.10.011>
- Park, J. C., & Im, S.-H. (2020). Of men in mice: The development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0473-2>
- Park, J.-H., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., Murata, Y., & Matozaki, T. (2016). Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. *PloS One*, 11(5), e0156334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156334>
- Pasterkamp, R. J. (2012). Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrn3302>
- Patterson, P. H. (2011). MATERNAL INFECTION AND IMMUNE INVOLVEMENT IN AUTISM. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), 389. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.001>
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Fu, Z., & Feng, G. (2011a). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472(7344), 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>
- Persico, A. M., & Napolioni, V. (2013). Urinary p-cresol in autism spectrum disorder. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.09.002>

- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Pham, T. D., Gershon, M. D., & Rothman, T. P. (1991). Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: Sequence in relation to phenotype. *The Journal of Comparative Neurology*, 314(4), 789–798. <https://doi.org/10.1002/cne.903140411>
- Phelan, K., & McDermid, H. E. (2012). The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Molecular Syndromology*, 2(3–5), 186–201. <https://doi.org/10.1159/000334260>
- Pierce, K., Gazestani, V. H., Bacon, E., Barnes, C. C., Cha, D., Nalabolu, S., Lopez, L., Moore, A., Pence-Stophaeros, S., & Courchesne, E. (2019). Evaluation of the Diagnostic Stability of the Early Autism Spectrum Disorder Phenotype in the General Population Starting at 12 Months. *JAMA Pediatrics*, 173(6), 578–587. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2019.0624>
- Plaza-Díaz, J., Gómez-Fernández, A., Chueca, N., Torre-Aguilar, M. J. de la, Gil, Á., Perez-Navero, J. L., Flores-Rojas, K., Martín-Borreguero, P., Solis-Urra, P., Ruiz-Ojeda, F. J., Garcia, F., & Gil-Campos, M. (2019). Autism Spectrum Disorder (ASD) with and without Mental Regression Is Associated with Changes in the Fecal Microbiota. *Nutrients*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/nu11020337>
- Poole, D. P., Godfrey, C., Cattaruzza, F., Cottrell, G. S., Kirkland, J. G., Pelayo, J. C., Bunnett, N. W., & Corvera, C. U. (2010). EXPRESSION AND FUNCTION OF THE BILE ACID RECEPTOR GPBAR1 (TGR5) IN THE MURINE ENTERIC NERVOUS SYSTEM. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(7), 814–e228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01487.x>
- Powley, T. L., & Phillips, R. J. (2011). Vagal intramuscular array afferents form complexes with interstitial cells of Cajal in gastrointestinal smooth muscle: Analogues of muscle spindle organs? *Neuroscience*, 186, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.04.036>
- Powley, T. L., Spaulding, R. A., & Haglof, S. A. (2011). Vagal afferent innervation of the proximal gastrointestinal tract mucosa: Chemoreceptor and mechanoreceptor architecture. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(4), 644–660. <https://doi.org/10.1002/cne.22541>
- Procházková, N., Falony, G., Dragsted, L. O., Licht, T. R., Raes, J., & Roager, H. M. (2023). Advancing human gut microbiota research by considering gut transit time. *Gut*, 72(1), 180–191. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328166>
- Pugsley, K., Scherer, S. W., Bellgrove, M. A., & Hawi, Z. (2022). Environmental exposures associated with elevated risk for autism spectrum disorder may augment the burden of deleterious de novo mutations among probands. *Molecular Psychiatry*, 27(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01142-w>
- Pusponegoro, H. D., Ismael, S., Sastroasmoro, S., Firmansyah, A., & Vandenplas, Y. (2015). Maladaptive Behavior and Gastrointestinal Disorders in Children with Autism Spectrum Disorder. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 18(4), 230–237. <https://doi.org/10.5223/pghn.2015.18.4.230>
- Putignani, L., Del Chierico, F., Petrucca, A., Vernocchi, P., & Dallapiccola, B. (2014). The human gut microbiota: A dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatric Research*, 76(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.49>

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), Article 7285. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Ramaswami, G., & Geschwind, D. H. (2018). Genetics of autism spectrum disorder. *Handbook of Clinical Neurology*, 147, 321–329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00021-X>
- Ramón y Cajal S. (1893). Neue darstellung vom histologischen bau des centralnervensystem. *Arch. Anat. Entwickl.* 1893, 319–428
- Rao, M. (2020). An increasingly complex view of intestinal motility. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0249-0>
- Rao, M., Nelms, B. D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M. D., & Corfas, G. (2015). Enteric glia express Proteolipid Protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*, 63(11), 2040–2057. <https://doi.org/10.1002/glia.22876>
- Reichardt, F., Chassaing, B., Nezami, B. G., Li, G., Tabatabavakili, S., Mwangi, S., Uppal, K., Liang, B., Vijay-Kumar, M., Jones, D., Gewirtz, A. T., & Srinivasan, S. (2017). Western diet induces colonic nitergic myenteric neuropathy and dysmotility in mice via saturated fatty acid- and lipopolysaccharide-induced TLR4 signalling. *The Journal of Physiology*, 595(5), 1831–1846. <https://doi.org/10.1113/JP273269>
- Reichenberg, A., Gross, R., Weiser, M., Bresnahan, M., Silverman, J., Harlap, S., Rabinowitz, J., Shulman, C., Malaspina, D., Lubin, G., Knobler, H. Y., Davidson, M., & Susser, E. (2006). Advancing Paternal Age and Autism. *Archives of General Psychiatry*, 63(9), 1026–1032. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.9.1026>
- Rellini, E., Tortolani, D., Trillo, S., Carbone, S., & Montecchi, F. (2004). Childhood Autism Rating Scale (CARS) and Autism Behavior Checklist (ABC) Correspondence and Conflicts with DSM-IV Criteria in Diagnosis of Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 34(6), 703–708. <https://doi.org/10.1007/s10803-004-5290-2>
- Restrepo, B., Angkustsiri, K., Taylor, S. L., Rogers, S. J., Cabral, J., Heath, B., Hechtman, A., Solomon, M., Ashwood, P., Amaral, D. G., & Nordahl, C. W. (2020). Developmental-behavioral profiles in children with autism spectrum disorder and co-occurring gastrointestinal symptoms. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 13(10), 1778–1789. <https://doi.org/10.1002/aur.2354>
- Reynolds, A. M., Soke, G. N., Sabourin, K. R., Croen, L. A., Daniels, J. L., Fallin, M. D., Kral, T. V. E., Lee, L.-C., Newschaffer, C. J., Pinto-Martin, J. A., Schieve, L. A., Sims, A., Wiggins, L., & Levy, S. E. (2021). Gastrointestinal Symptoms in 2- to 5-Year-Old Children in the Study to Explore Early Development. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 51(11), 3806–3817. <https://doi.org/10.1007/s10803-020-04786-9>
- Richards, C., Jones, C., Groves, L., Moss, J., & Oliver, C. (2015). Prevalence of autism spectrum disorder phenomenology in genetic disorders: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Psychiatry*, 2(10), 909–916. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00376-4)
- Richardson, A., Delbridge, A. T., Brown, N. J., Rumsey, R. D., & Read, N. W. (1991). Short chain fatty acids in the terminal ileum accelerate stomach to caecum transit time in the rat. *Gut*, 32(3), 266–269.

- Riddle, K., Cascio, C. J., & Woodward, N. D. (2017). Brain structure in autism: A voxel-based morphometry analysis of the Autism Brain Imaging Database Exchange (ABIDE). *Brain Imaging and Behavior*, 11(2), 541–551. <https://doi.org/10.1007/s11682-016-9534-5>
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., Dodsworth, J. A., Hedlund, B. P., Tsiamis, G., Sievert, S. M., Liu, W.-T., Eisen, J. A., Hallam, S. J., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., ... Woyke, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459), Article 7459. <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- Robertson, M. A., Sigalet, D. L., Holst, J. J., Meddings, J. B., Wood, J., & Sharkey, K. A. (2008). Intestinal permeability and glucagon-like peptide-2 in children with autism: A controlled pilot study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 38(6), 1066–1071. <https://doi.org/10.1007/s10803-007-0482-1>
- Robinson, B. G., Oster, B. A., Robertson, K., & Kaltschmidt, J. A. (2023). *Loss of ASD-Related Molecule Cntnap2 Affects Colonic Motility in Mice* (p. 2023.04.17.537221). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.04.17.537221>
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., & Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26050. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Rogel-Gaillard, C., Larzul, C., Estellé, J., Borey, M., Blanc, F., Lemonnier, G., Jardet, D., Lecardonnel, J., Billon, Y., Thiam, M.-G., Oñate, F., Quinquis, B., & Galleron, N. (2023). *Driving gut microbiota enterotypes through host genetics*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3081627/v1>
- Rolig, A. S., Mittge, E. K., Ganz, J., Troll, J. V., Melancon, E., Wiles, T. J., Alligood, K., Stephens, W. Z., Eisen, J. S., & Guillemin, K. (2017). The enteric nervous system promotes intestinal health by constraining microbiota composition. *PLOS Biology*, 15(2), e2000689. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000689>
- Russell, D. W. (2009). Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl(Suppl), S120-125. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800026-JLR200>
- Sanders, S. J., He, X., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., Samocha, K. E., Cicek, A. E., Murtha, M. T., Bal, V. H., Bishop, S. L., Dong, S., Goldberg, A. P., Jinlu, C., Keaney, J. F., Klei, L., Mandell, J. D., Moreno-De-Luca, D., Poultney, C. S., Robinson, E. B., Smith, L., ... State, M. W. (2015). Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*, 87(6), 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.016>
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA*, 311(17), 1770–1777. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144>
- Saranghi, A. N., Goel, A., & Aggarwal, R. (2019). Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 9(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.iceh.2018.04.016>
- Sasselli, V., Pachnis, V., & Burns, A. J. (2012). The enteric nervous system. *Developmental Biology*, 366(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.01.012>

- Satterstrom, F. K., Kosmicki, J. A., Wang, J., Breen, M. S., De Rubeis, S., An, J.-Y., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M. S., Artomov, M., Gerges, S., Sheppard, B., Xu, X., Bhaduri, A., Norman, U., ... Buxbaum, J. D. (2020). Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*, 180(3), 568-584.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036>
- Saunders, J. M., Moreno, J. L., Ibi, D., Sikaroodi, M., Kang, D. J., Muñoz-Moreno, R., Dalmet, S. S., García-Sastre, A., Gillevet, P. M., Dozmorov, M. G., Bajaj, J. S., & González-Maeso, J. (2020). Gut microbiota manipulation during the prepubertal period shapes behavioral abnormalities in a mouse neurodevelopmental disorder model. *Scientific Reports*, 10(1), 4697. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61635-6>
- Schemann, M., & Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility*, 16(s1), 55–59. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x>
- Schemann, M., Frieling, T., & Enck, P. (2020). To learn, to remember, to forget—How smart is the gut? *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 228(1), e13296. <https://doi.org/10.1111/apha.13296>
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(3), 350–358. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>
- Schmitt, L. M., Smith, E. G., Pedapati, E. V., Horn, P. S., Will, M., Lamy, M., Barber, L., Trebley, J., Meyer, K., Heiman, M., West, K. H. J., Hughes, P., Ahuja, S., & Erickson, C. A. (2023). Results of a phase Ib study of SB-121, an investigational probiotic formulation, a randomized controlled trial in participants with autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, 13, 5192. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30909-0>
- Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F., & Daly, K. (1980). Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 10(1), 91–103. <https://doi.org/10.1007/BF02408436>
- Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, 9(8), 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Sgritta, M., Dooling, S. W., Buffington, S. A., Momin, E. N., Francis, M. B., Britton, R. A., & Costa-Mattioli, M. (2019a). Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron*, 101(2), 246-259.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.018>
- Shaaban, S. Y., El Gendy, Y. G., Mehanna, N. S., El-Senousy, W. M., El-Feki, H. S. A., Saad, K., & El-Asheer, O. M. (2018). The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutritional Neuroscience*, 21(9), 676–681. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1347746>
- Sharkey, K. A., & Mawe, G. M. (2023). The enteric nervous system. *Physiological Reviews*, 103(2), 1487–1564. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2022>
- Sharon, G., Cruz, N. J., Kang, D.-W., Gandal, M. J., Wang, B., Kim, Y.-M., Zink, E. M., Casey, C. P., Taylor, B. C., Lane, C. J., Bramer, L. M., Isern, N. G., Hoyt, D. W., Noecker, C., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Borenstein, E., Jansson, J. K., Knight, R., ... Mazmanian, S. K. (2019). Human Gut

- Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*, 177(6), 1600-1618.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.004>
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00209>
- Shen, S., Huang, D., Qian, S., Ye, X., Zhuang, Q., Wan, X., & Dong, Z. (2023). Hyodeoxycholic acid attenuates cholesterol gallstone formation via modulation of bile acid metabolism and gut microbiota. *European Journal of Pharmacology*, 955, 175891. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175891>
- Shen, Y., Xu, J., Li, Z., Huang, Y., Yuan, Y., Wang, J., Zhang, M., Hu, S., & Liang, Y. (2018). Analysis of gut microbiota diversity and auxiliary diagnosis as a biomarker in patients with schizophrenia: A cross-sectional study. *Schizophrenia Research*, 197, 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.01.002>
- Shiff, S. J., Soloway, R. D., & Snape, W. J. (1982). Mechanism of deoxycholic acid stimulation of the rabbit colon. *The Journal of Clinical Investigation*, 69(4), 985–992. <https://doi.org/10.1172/jci110538>
- Shinawi, M., Liu, P., Kang, S.-H. L., Shen, J., Belmont, J. W., Scott, D. A., Probst, F. J., Craigen, W. J., Graham, B. H., Pursley, A., Clark, G., Lee, J., Proud, M., Stocco, A., Rodriguez, D. L., Kozel, B. A., Sparagana, S., Roeder, E. R., McGrew, S. G., ... Lupski, J. R. (2010). Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of Medical Genetics*, 47(5), 332–341. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.073015>
- Singer, A. B., Aylsworth, A. S., Cordero, C., Croen, L. A., DiGuseppi, C., Fallin, M. D., Herring, A. H., Hooper, S. R., Pretzel, R. E., Schieve, L. A., Windham, G. C., & Daniels, J. L. (2017). Prenatal Alcohol Exposure in Relation to Autism Spectrum Disorder: Findings from the Study to Explore Early Development (SEED). *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 31(6), 573–582. <https://doi.org/10.1111/ppe.12404>
- Sivaprakasam, S., Bhutia, Y. D., Yang, S., & Ganapathy, V. (2017). Short-Chain Fatty Acid Transporters: Role in Colonic Homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 299–314. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170014>
- Smith, M. J., Ellenberg, S. S., Bell, L. M., & Rubin, D. M. (2008). Media coverage of the measles-mumps-rubella vaccine and autism controversy and its relationship to MMR immunization rates in the United States. *Pediatrics*, 121(4), e836-843. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-1760>
- Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J., & Rosenstiel, P. (2017a). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58>
- Song, M., Yang, Q., Zhang, F., Chen, L., Su, H., Yang, X., He, H., Liu, F., Zheng, J., Ling, M., Lai, X., Zhu, X., Wang, L., Gao, P., Shu, G., Jiang, Q., & Wang, S. (2020). Hyodeoxycholic acid (HDCA) suppresses intestinal epithelial cell proliferation through FXR-PI3K/AKT pathway, accompanied by alteration of bile acids metabolism profiles induced by gut bacteria. *The FASEB Journal*, 34(5), 7103–7117. <https://doi.org/10.1096/fj.201903244R>

- Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J. P., & Neunlist, M. (2010). Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology*, *138*(5), 1772–1782. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.053>
- Sparrow, S. S., Cicchetti, D. V., & Saulnier, C. A. (2016). *Vineland Adaptive Behavior Scales* (3rd ed.). Pearson Education
- Spinazzi, N. A., Santoro, J. D., Pawlowski, K., Anzueto, G., Howe, Y. J., Patel, L. R., & Baumer, N. T. (2023). Co-occurring conditions in children with Down syndrome and autism: A retrospective study. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *15*, 9. <https://doi.org/10.1186/s11689-023-09478-w>
- Średnicka, P., Roszko, M. Ł., Popowski, D., Kowalczyk, M., Wójcicki, M., Emanowicz, P., Szczepańska, M., Kotyrba, D., & Juszcuk-Kubiak, E. (2023). Effect of in vitro cultivation on human gut microbiota composition using 16S rDNA amplicon sequencing and metabolomics approach. *Scientific Reports*, *13*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29637-2>
- Stenkamp-Strahm, C. M., Nyavor, Y. E. A., Kappmeyer, A. J., Horton, S., Gericke, M., & Balemba, O. B. (2015). Prolonged high fat diet ingestion, obesity, and type 2 diabetes symptoms correlate with phenotypic plasticity in myenteric neurons and nerve damage in the mouse duodenum. *Cell and Tissue Research*, *361*(2), 411–426. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2132-9>
- Su, A. L., & Loch-Carusio, R. (2020). Comparison of rat fetal sex determination using placental gDNA and mRNA via qRT-PCR. *Journal of Molecular Biology and Methods*, *3*(2), 107.
- Sun, Y. (2004). Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut*, *53*(3), 362–367. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.015867>
- Surén, P., Roth, C., Bresnahan, M., Haugen, M., Hornig, M., Hirtz, D., Lie, K. K., Lipkin, W. I., Magnus, P., Reichborn-Kjennerud, T., Schjølberg, S., Davey Smith, G., Øyen, A.-S., Susser, E., & Stoltenberg, C. (2013). Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *JAMA*, *309*(6), 570–577. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.155925>
- Syriopoulou-Delli, C. K., & Folostina, R. (Eds.). (2022). *Interventions for Improving Adaptive Behaviors in Children With Autism Spectrum Disorders: IGI Global*. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-8217-6>
- Szatmari, P., Paterson, A., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.-Q., Vincent, J., Skaug, J., Thompson, A., Senman, L., Feuk, L., Qian, C., Bryson, S., Jones, M., Marshall, C., Scherer, S., Vieland, V., Bartlett, C., Mangin, L. V., ... Meyer, K. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature Genetics*, *39*(3), 319–328. <https://doi.org/10.1038/ng1985>
- Tabouy, L., Getselter, D., Ziv, O., Karpuj, M., Tabouy, T., Lukic, I., Maayouf, R., Werbner, N., Ben-Amram, H., Nuriel-Ohayon, M., Koren, O., & Elliott, E. (2018). Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, *73*, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.05.015>
- Tao, Y., Zhou, H., Li, Z., Wu, H., Wu, F., Miao, Z., Shi, H., Huang, F., & Wu, X. (2023). TGR5 deficiency-induced anxiety and depression-like behaviors: The role of gut microbiota dysbiosis. *Journal of Affective Disorders*, *344*, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2023.10.072>

- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D. L. E., Nalin, R., Dore, J., & Leclerc, M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, *11*(10), 2574–2584. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x>
- Tartaglione, A. M., Paziienza, V., Calamandrei, G., & Ricceri, L. (2023). A snapshot of gut microbiota data from murine models of Autism Spectrum Disorder: Still a blurred picture. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *147*, 105105. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105105>
- Tartaglione, A. M., Villani, A., Ajmone-Cat, M. A., Minghetti, L., Ricceri, L., Paziienza, V., De Simone, R., & Calamandrei, G. (2022). Maternal immune activation induces autism-like changes in behavior, neuroinflammatory profile and gut microbiota in mouse offspring of both sexes. *Translational Psychiatry*, *12*(1), 384. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02149-9>
- Taylor, L. E., Swerdfeger, A. L., & Eslick, G. D. (2014). Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine*, *32*(29), 3623–3629. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.085>
- Thapar, A., & Rutter, M. (2021). Genetic Advances in Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *51*(12), 4321–4332. <https://doi.org/10.1007/s10803-020-04685-z>
- Theis, K. R., Romero, R., Winters, A. D., Greenberg, J. M., Gomez-Lopez, N., Alhousseini, A., Bieda, J., Maymon, E., Pacora, P., Fettweis, J. M., Buck, G. A., Jefferson, K. K., Strauss, J. F., Erez, O., & Hassan, S. S. (2019). Does the human placenta delivered at term have a microbiota? Results of cultivation, quantitative real-time PCR, 16S rRNA gene sequencing, and metagenomics. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *220*(3), 267.e1-267.e39. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.10.018>
- Tick, B., P, B., F, H., M, R., & F, R. (2016). Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, *57*(5). <https://doi.org/10.1111/jcpp.12499>
- Tomova, A., Soltys, K., Repiska, G., Palkova, L., Filcikova, D., Minarik, G., Turna, J., Prochotska, K., Babinska, K., & Ostatnikova, D. (2020). Specificity of gut microbiota in children with autism spectrum disorder in Slovakia and its correlation with astrocytes activity marker and specific behavioural patterns. *Physiology & Behavior*, *214*, 112745. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112745>
- Toumi, F., Neunlist, M., Cassagnau, E., Parois, S., Laboisse, C. L., Galmiche, J.-P., & Jarry, A. (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: Evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterology and Motility*, *15*(3), 239–242. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2003.00409.x>
- Tran, T. S., Kolodkin, A. L., & Bharadwaj, R. (2007). Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *23*, 263–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093554>
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, *489*(7415), Article 7415. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
- Trendelenburg, P. (1917). Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology - NAUNYN-SCHMIED ARCH PHARMACOL*, *81*, 55–129. <https://doi.org/10.1007/BF01862644>

- Tuchman, R., & Rapin, I. (2002). Epilepsy in autism. *The Lancet. Neurology*, 1(6), 352–358. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(02\)00160-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(02)00160-6)
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), Article 7122. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Turner, L. M., & Stone, W. L. (2007). Variability in outcome for children with an ASD diagnosis at age 2. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 48(8), 793–802. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2007.01744.x>
- Uesaka, T., Nagashimada, M., & Enomoto, H. (2013). GDNF Signaling Levels Control Migration and Neuronal Differentiation of Enteric Ganglion Precursors. *Journal of Neuroscience*, 33(41), 16372–16382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2079-13.2013>
- Urbonaite, G., Knyzeliene, A., Bunn, F. S., Smalskys, A., & Neniskyte, U. (2022). The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 909762. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.909762>
- Vanden Berghe, P., & Klingauf, J. (2007). Spatial organization and dynamic properties of neurotransmitter release sites in the enteric nervous system. *Neuroscience*, 145(1), 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.048>
- Vannucchi, M. G., & Fausone-Pellegrini, M. S. (2000). Synapse formation during neuron differentiation: An in situ study of the myenteric plexus during murine embryonic life. *The Journal of Comparative Neurology*, 425(3), 369–381. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000925\)425:3<369::aid-cne3>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000925)425:3<369::aid-cne3>3.0.co;2-7)
- Verbeke, L., Farre, R., Verbinnen, B., Covens, K., Vanuytsel, T., Verhaegen, J., Komuta, M., Roskams, T., Chatterjee, S., Annaert, P., Vander Elst, I., Windmolders, P., Trebicka, J., Nevens, F., & Laleman, W. (2015). The FXR agonist obeticholic acid prevents gut barrier dysfunction and bacterial translocation in cholestatic rats. *The American Journal of Pathology*, 185(2), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.009>
- Vernocchi, P., Del Chierico, F., & Putignani, L. (2016). Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01144>
- Vicentini, F. A., Keenan, C. M., Wallace, L. E., Woods, C., Cavin, J.-B., Flockton, A. R., Macklin, W. B., Belkind-Gerson, J., Hirota, S. A., & Sharkey, K. A. (2021). Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia. *Microbiome*, 9(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01165-z>
- Vikhanski, L. (2016). *Immunity: How Elie Metchnikoff Changed the Course of Modern Medicine*. Chicago Review Press.
- Visser, J. C., Rommelse, N., Vink, L., Schrieken, M., Oosterling, I. J., van der Gaag, R. J., & Buitelaar, J. K. (2013). Narrowly versus broadly defined autism spectrum disorders: Differences in pre- and perinatal risk factors. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43(7), 1505–1516. <https://doi.org/10.1007/s10803-012-1678-6>

- Vivanti, G., Prior, M., Williams, K., & Dissanayake, C. (2014). Predictors of Outcomes in Autism Early Intervention: Why Don't We Know More? *Frontiers in Pediatrics*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2014.00058>
- Volkmar, F. R., & McPartland, J. C. (2014). From Kanner to DSM-5: Autism as an evolving diagnostic concept. *Annual Review of Clinical Psychology*, 10, 193–212. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032813-153710>
- Wachsmuth, H. R., Weninger, S. N., & Duca, F. A. (2022). Role of the gut–brain axis in energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00677-w>
- Wahba, G., Schock, S. C., Cudd, S., Grynspan, D., Humphreys, P., & Staines, W. A. (2016). Activity and MeCP2-dependent regulation of nNOS levels in enteric neurons. *Neurogastroenterology and Motility*, 28(11), 1723–1730. <https://doi.org/10.1111/nmo.12873>
- Wahlsten, D., Metten, P., & Crabbe, J. C. (2003). Survey of 21 inbred mouse strains in two laboratories reveals that BTBR T/+ tf/tf has severely reduced hippocampal commissure and absent corpus callosum. *Brain Research*, 971(1), 47–54. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02354-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02354-0)
- Wakefield, A., Murch, S., Anthony, A., Linnell, J., Casson, D., Malik, M., Berelowitz, M., Dhillon, A., Thomson, M., Harvey, P., Valentine, A., Davies, S., & Walker-Smith, J. (1998). **RETRACTED:** Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *The Lancet*, 351(9103), 637–641. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)11096-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11096-0)
- Wallace, A. S., & Burns, A. J. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research*, 319(3), 367–382. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1023-2>
- Walter, J., & Hornef, M. W. (2021). A philosophical perspective on the prenatal in utero microbiome debate. *Microbiome*, 9(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00979-7>
- Wan, Y., Zuo, T., Xu, Z., Zhang, F., Zhan, H., Chan, D., Leung, T.-F., Yeoh, Y. K., Chan, F. K. L., Chan, R., & Ng, S. C. (2022). Underdevelopment of the gut microbiota and bacteria species as non-invasive markers of prediction in children with autism spectrum disorder. *Gut*, 71(5), 910–918. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-324015>
- Wang, J., Cao, Y., Hou, W., Bi, D., Yin, F., Gao, Y., Huang, D., Li, Y., Cao, Z., Yan, Y., Zhao, J., Kong, D., Lv, X., Huang, L., Zhong, H., Wu, C., Chen, Q., Yang, R., Wei, Q., & Qin, H. (2023). Fecal microbiota transplantation improves VPA-induced ASD mice by modulating the serotonergic and glutamatergic synapse signaling pathways. *Translational Psychiatry*, 13(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02307-7>
- Wang, L., Wang, B., Wu, C., Wang, J., & Sun, M. (2023). Autism Spectrum Disorder: Neurodevelopmental Risk Factors, Biological Mechanism, and Precision Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1819. <https://doi.org/10.3390/ijms24031819>
- Wang, X., Chan, A. K. K., Sham, M. H., Burns, A. J., & Chan, W. Y. (2011). Analysis of the Sacral Neural Crest Cell Contribution to the Hindgut Enteric Nervous System in the Mouse Embryo. *Gastroenterology*, 141(3), 992-1002.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.002>

- Wang, Y., Tang, S., Xu, S., Weng, S., & Liu, Z. (2016). Maternal Body Mass Index and Risk of Autism Spectrum Disorders in Offspring: A Meta-analysis. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep34248>
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345(6270), 63–65. <https://doi.org/10.1038/345063a0>
- Ward, N. L., Pieretti, A., Dowd, S. E., Cox, S. B., & Goldstein, A. M. (2012). Intestinal aganglionosis is associated with early and sustained disruption of the colonic microbiome. *Neurogastroenterology and Motility*, 24(9), 874–e400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01937.x>
- Ward, S. M., & Sanders, K. M. (2001). Interstitial cells of Cajal: Primary targets of enteric motor innervation. *The Anatomical Record*, 262(1), 125–135. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<125::AID-AR1017>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<125::AID-AR1017>3.0.CO;2-I)
- Watanabe, S., Chen, Z., Fujita, K., Nishikawa, M., Ueda, H., Iguchi, Y., Une, M., Nishida, T., & Imura, J. (2022). Hyodeoxycholic Acid (HDCA) Prevents Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice: Possible Role of Synergism between DSS and HDCA in Increasing Fecal Bile Acid Levels. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 45(10), 1503–1509. <https://doi.org/10.1248/bpb.b22-00373>
- Weiss, L. A., Arking, D. E., Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly, M. J., & Chakravarti, A. (2009). A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*, 461(7265), 802–808. <https://doi.org/10.1038/nature08490>
- Weiss, L. A., Escayg, A., Kearney, J. A., Trudeau, M., MacDonald, B. T., Mori, M., Reichert, J., Buxbaum, J. D., & Meisler, M. H. (2003). Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. *Molecular Psychiatry*, 8(2), 186–194. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001241>
- Weiss, L. A., Shen, Y., Korn, J. M., Arking, D. E., Miller, D. T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M. A. R., Green, T., Platt, O. S., Ruderfer, D. M., Walsh, C. A., Altshuler, D., Chakravarti, A., Tanzi, R. E., Stefansson, K., Santangelo, S. L., Gusella, J. F., ... Daly, M. J. (2008). Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. *New England Journal of Medicine*, 358(7), 667–675. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa075974>
- Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (n.d.). Next-generation sequencing: Insights to advance clinical investigations of the microbiome. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(7), e154944. <https://doi.org/10.1172/JCI154944>
- West, K. A., Yin, X., Rutherford, E. M., Wee, B., Choi, J., Chrisman, B. S., Dunlap, K. L., Hannibal, R. L., Hartono, W., Lin, M., Raack, E., Sabino, K., Wu, Y., Wall, D. P., David, M. M., Dabbagh, K., DeSantis, T. Z., & Iwai, S. (2022). Multi-angle meta-analysis of the gut microbiome in Autism Spectrum Disorder: A step toward understanding patient subgroups. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21327-9>
- Wieggersma, A. M., Dalman, C., Lee, B. K., Karlsson, H., & Gardner, R. M. (2019). Association of Prenatal Maternal Anemia With Neurodevelopmental Disorders. *JAMA Psychiatry*, 76(12), 1294–1304. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.2309>
- Williams, B. L., Hornig, M., Buie, T., Bauman, M. L., Paik, M. C., Wick, I., Bennett, A., Jabado, O., Hirschberg, D. L., & Lipkin, W. I. (2011). Impaired Carbohydrate Digestion and Transport and

- Mucosal Dysbiosis in the Intestines of Children with Autism and Gastrointestinal Disturbances. *PLOS ONE*, 6(9), e24585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024585>
- Wing, L. (1981). Asperger's syndrome: A clinical account. *Psychological Medicine*, 11(1), 115–129. <https://doi.org/10.1017/S0033291700053332>
- Wong, C. C. Y., Meaburn, E. L., Ronald, A., Price, T. S., Jeffries, A. R., Schalkwyk, L. C., Plomin, R., & Mill, J. (2014). Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Molecular Psychiatry*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.41>
- Wood, J. D., & Kirchgessner, A. (2004). Slow excitatory metabotropic signal transmission in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility*, 16 Suppl 1, 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00479.x>
- Wu, S., Wu, F., Ding, Y., Hou, J., Bi, J., & Zhang, Z. (2017). Advanced parental age and autism risk in children: A systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 135(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/acps.12666>
- Wulffaert, J., Van Berckelaer-Onnes, I. A., & Scholte, E. M. (2009). Autistic disorder symptoms in Rett syndrome. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, 13(6), 567–581. <https://doi.org/10.1177/1362361309338184>
- Xiang, A. H., Wang, X., Martinez, M. P., Walthall, J. C., Curry, E. S., Page, K., Buchanan, T. A., Coleman, K. J., & Getahun, D. (2015). Association of maternal diabetes with autism in offspring. *JAMA*, 313(14), 1425–1434. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.2707>
- Xiao, L., Yan, J., Yang, T., Zhu, J., Li, T., Wei, H., & Chen, J. (2021). Fecal Microbiome Transplantation from Children with Autism Spectrum Disorder Modulates Tryptophan and Serotonergic Synapse Metabolism and Induces Altered Behaviors in Germ-Free Mice. *mSystems*, 6(2), e01343-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01343-20>
- Xie, R., Sun, Y., Wu, J., Huang, S., Jin, G., Guo, Z., Zhang, Y., Liu, T., Liu, X., Cao, X., Wang, B., & Cao, H. (2018). Maternal high fat diet alters gut microbiota of offspring and exacerbates dss-induced colitis in adulthood. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV). Scopus. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02608>
- Xing, C., Huang, X., Wang, D., Yu, D., Hou, S., Cui, H., & Song, L. (2023). Roles of bile acids signaling in neuromodulation under physiological and pathological conditions. *Cell & Bioscience*, 13(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s13578-023-01053-z>
- Yajima, T. (1985). Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *The Journal of Physiology*, 368, 667–678.
- Yang, J., Pu, J., Lu, S., Bai, X., Wu, Y., Jin, D., Cheng, Y., Zhang, G., Zhu, W., Luo, X., Rosselló-Móra, R., & Xu, J. (2020). Species-Level Analysis of Human Gut Microbiota With Metataxonomics. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.02029>
- Yang, M., Zhodzishsky, V., & Crawley, J. N. (2007). Social Deficits in BTBR T+tf/J Mice are Unchanged by Cross-Fostering with C57BL/6J Mothers. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 25(8), 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.09.008>

- Yap, C. X., Henders, A. K., Alvares, G. A., Wood, D. L. A., Krause, L., Tyson, G. W., Restuadi, R., Wallace, L., McLaren, T., Hansell, N. K., Cleary, D., Grove, R., Hafekost, C., Harun, A., Holdsworth, H., Jellett, R., Khan, F., Lawson, L. P., Leslie, J., ... Gratten, J. (2021). Autism-related dietary preferences mediate autism-gut microbiome associations. *Cell*, *184*(24), 5916-5931.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.015>
- Yasui, D. H., Peddada, S., Bieda, M. C., Vallero, R. O., Hogart, A., Nagarajan, R. P., Thatcher, K. N., Farnham, P. J., & LaSalle, J. M. (2007). Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19416–19421. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707442104>
- Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, *486*(7402), Article 7402. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Young, D. J., Bebbington, A., Anderson, A., Ravine, D., Ellaway, C., Kulkarni, A., de Klerk, N., Kaufmann, W. E., & Leonard, H. (2008). The diagnosis of autism in a female: Could it be Rett syndrome? *European Journal of Pediatrics*, *167*(6), 661–669. <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0569-x>
- Young, H. M. (2008). Functional development of the enteric nervous system – from migration to motility. *Neurogastroenterology & Motility*, *20*(s1), 20–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01098.x>
- Young, H. M., & Furness, J. B. (1995). Ultrastructural examination of the targets of serotonin immunoreactive descending interneurons in the guinea pig small intestine. *The Journal of Comparative Neurology*, *356*(1), 101–114. <https://doi.org/10.1002/cne.903560107>
- Yu, Q., Du, M., Zhang, W., Liu, L., Gao, Z., Chen, W., Gu, Y., Zhu, K., Niu, X., Sun, Q., & Wang, L. (2021). Mesenteric Neural Crest Cells Are the Embryological Basis of Skip Segment Hirschsprung's Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *12*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.12.010>
- Yu, Y., Zhang, B., Ji, P., Zuo, Z., Huang, Y., Wang, N., Liu, C., Liu, S.-J., & Zhao, F. (2022). Changes to gut amino acid transporters and microbiome associated with increased E/I ratio in Chd8+/- mouse model of ASD-like behavior. *Nature Communications*, *13*, 1151. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28746-2>
- Yurkovetskiy, L., Burrows, M., Khan, A. A., Graham, L., Volchkov, P., Becker, L., Antonopoulos, D., Umesaki, Y., & Chervonsky, A. V. (2013). Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity*, *39*(2), 10.1016/j.immuni.2013.08.013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.013>
- Zagorodnyuk, V. P., Chen, B. N., & Brookes, S. J. H. (2001). Intraganglionic laminar endings are mechano-transduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. *The Journal of Physiology*, *534*(Pt 1), 255–268. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00255.x>
- Zang, J. B., Nosyreva, E. D., Spencer, C. M., Volk, L. J., Musunuru, K., Zhong, R., Stone, E. F., Yuva-Paylor, L. A., Huber, K. M., Paylor, R., Darnell, J. C., & Darnell, R. B. (2009). A Mouse Model of the Human Fragile X Syndrome I304N Mutation. *PLOS Genetics*, *5*(12), e1000758. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000758>

- Zeidan, J., Fombonne, E., Scora, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., & Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*, 15(5), 778–790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>
- Zeng, H., Umar, S., Rust, B., Lazarova, D., & Bordonaro, M. (2019). Secondary Bile Acids and Short Chain Fatty Acids in the Colon: A Focus on Colonic Microbiome, Cell Proliferation, Inflammation, and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1214. <https://doi.org/10.3390/ijms20051214>
- Zhai, L., Xiao, H., Lin, C., Wong, H. L. X., Lam, Y. Y., Gong, M., Wu, G., Ning, Z., Huang, C., Zhang, Y., Yang, C., Luo, J., Zhang, L., Zhao, L., Zhang, C., Lau, J. Y.-N., Lu, A., Lau, L.-T., Jia, W., ... Bian, Z.-X. (2023). Gut microbiota-derived tryptamine and phenethylamine impair insulin sensitivity in metabolic syndrome and irritable bowel syndrome. *Nature Communications*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40552-y>
- Zhang, B., Willing, M., Grange, D. K., Shinawi, M., Manwaring, L., Vineyard, M., Kulkarni, S., & Cottrell, C. E. (2016). Multigenerational autosomal dominant inheritance of 5p chromosomal deletions. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 170(3), 583–593. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37445>
- Zhang, J., Zhu, G., Wan, L., Liang, Y., Liu, X., Yan, H., Zhang, B., & Yang, G. (2023). Effect of fecal microbiota transplantation in children with autism spectrum disorder: A systematic review. *Frontiers in Psychiatry*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2023.1123658>
- Zhang, L., Song, J., Bai, T., Wang, R., & Hou, X. (2018). Sustained pain hypersensitivity in the stressed colon: Role of mast cell-derived nerve growth factor-mediated enteric synaptic plasticity. *Neurogastroenterology & Motility*, 30(9), e13430. <https://doi.org/10.1111/nmo.13430>
- Zhang, M., Ma, W., Zhang, J., He, Y., & Wang, J. (2018). Analysis of gut microbiota profiles and microbe-disease associations in children with autism spectrum disorders in China. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32219-2>
- Zhang, Q., Zou, R., Guo, M., Duan, M., Li, Q., & Zheng, H. (2021). Comparison of gut microbiota between adults with autism spectrum disorder and obese adults. *PeerJ*, 9, e10946. <https://doi.org/10.7717/peerj.10946>
- Zhang, T., Zhang, C., Zhang, J., Sun, F., & Duan, L. (2022). Efficacy of Probiotics for Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 859967. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.859967>
- Zhang, Y., Li, N., Li, C., Zhang, Z., Teng, H., Wang, Y., Zhao, T., Shi, L., Zhang, K., Xia, K., Li, J., & Sun, Z. (2020). Genetic evidence of gender difference in autism spectrum disorder supports the female-protective effect. *Translational Psychiatry*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0699-8>
- Zhang, Y., Zhang, J., Pan, Z., & He, X. (2022). Effects of Washed Fecal Bacteria Transplantation in Sleep Quality, Stool Features and Autism Symptomatology: A Chinese Preliminary Observational Study. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 18, 1165. <https://doi.org/10.2147/NDT.S355233>
- Zheng, Y., Lv, X., Wang, D., Gao, N., Zhang, Q., & Li, A. (2017). Down-regulation of fibronectin and the correlated expression of neuroligin in hirschsprung disease. *Neurogastroenterology & Motility*, 29(12), e13134. <https://doi.org/10.1111/nmo.13134>

- Zhu, H., Bai, Y., Wang, G., Su, Y., Tao, Y., Wang, L., Yang, L., Wu, H., Huang, F., Shi, H., & Wu, X. (2022). Hyodeoxycholic acid inhibits lipopolysaccharide-induced microglia inflammatory responses through regulating TGR5/AKT/NF- κ B signaling pathway. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 36(7), 849–859. <https://doi.org/10.1177/02698811221089041>
- Zhu, Y., Mordaunt, C. E., Yasui, D. H., Marathe, R., Coulson, R. L., Dunaway, K. W., Jianu, J. M., Walker, C. K., Ozonoff, S., Hertz-Picciotto, I., Schmidt, R. J., & LaSalle, J. M. (2019). Placental DNA methylation levels at CYP2E1 and IRS2 are associated with child outcome in a prospective autism study. *Human Molecular Genetics*, 28(16), 2659–2674. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz084>
- Zhuang, Z., Yang, R., Wang, W., Qi, L., & Huang, T. (2020). Associations between gut microbiota and Alzheimer’s disease, major depressive disorder, and schizophrenia. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 288. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01961-8>
- Zou, R., Xu, F., Wang, Y., Duan, M., Guo, M., Zhang, Q., Zhao, H., & Zheng, H. (2020). Changes in the Gut Microbiota of Children with Autism Spectrum Disorder. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 13(9), 1614–1625.

A ma maman avant moi,
et à sa maman avant elle...

Titre : Etude du système nerveux entérique au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les troubles du spectre de l'autisme

Mots clés : Système nerveux entérique, autisme, connectivité neuronale, sémaphorine 5A, microbiote intestinal, acides biliaires

Résumé : Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) regroupent des troubles neurodéveloppementaux caractérisés par des déficits dans les interactions sociales, des intérêts restreints et des comportements stéréotypés. Les TSA touchent environ 1 % de la population et résultent de facteurs génétiques et environnementaux. Les troubles gastro-intestinaux, tels que la constipation chronique et la diarrhée, sont courants dans les TSA, affectant 70 % des individus.

Le SNE est une composante essentielle des fonctions digestives, et son altération entraîne des troubles gastro-intestinaux. Néanmoins, l'origine des troubles gastro-intestinaux dans l'autisme reste mal comprise. Parmi les facteurs et mécanismes capables de remodeler le SNE, le microbiote intestinal, retrouvé modifié dans l'autisme, pourrait jouer un rôle important. En effet, microbiote, SNE et cerveau sont interconnectés, formant l'axe microbiote-intestin-cerveau.

Ce travail de thèse se découpe en deux projets interconnectés étudiant la physiopathologie des troubles gastro-intestinaux dans l'autisme via l'implication du SNE.

Le premier projet explore le rôle de la protéine de guidage axonal Sémaphorine 5A (Sema5A) et de ses mutations dans l'autisme sur la maturation et la connectivité du SNE. Son gène *SEMA5A* est un gène de susceptibilité à l'autisme et ses implications dans le SNE restent largement inconnues. Nous avons montré que la Sema5A régule la connectivité neuronale et leur activité synaptique et une version mutée de la Sema5A, associée à l'autisme, abolit ces effets.

Le deuxième projet se concentre sur l'impact des acides biliaires secondaires dérivés du microbiote, augmentés chez les femmes atteintes de TSA, sur la connectivité du SNE. Cette recherche vise à explorer les liens potentiels entre la dysbiose intestinale, le métabolisme altéré des acides biliaires, et les dysfonctionnements gastro-intestinaux dans l'autisme.

Title: Study of the Enteric Nervous System within the Microbiota-Gut-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders

Keywords: Enteric nervous system, autism, neuronal connectivity, gut microbiota, bile acids

Abstract: Autism Spectrum Disorder (ASD) comprises neurodevelopmental disorders characterized by deficits in social interactions, restricted interests, and stereotyped behaviors. ASD affects approximately 1% of the population and results from genetic and environmental factors. Gastrointestinal issues, such as chronic constipation and diarrhea, are common in ASD, affecting 70% of individuals.

The Enteric Nervous System (ENS) is a vital component of digestive functions, and its alteration leads to gastrointestinal problems. However, the origin of gastrointestinal issues in autism remains poorly understood. Among the factors and mechanisms capable of influencing the ENS, the intestinal microbiota, which is found to be altered in autism, could play a significant role. Indeed, the microbiota, ENS, and brain are interconnected, forming the microbiota-gut-brain axis.

This thesis is divided into two interconnected projects that study the pathophysiology of gastrointestinal disorders in autism through the involvement of the ENS. The first project explores the role of the axon guidance protein Semaphorin 5A (Sema5A) and its mutations in autism on the maturation and connectivity of the ENS. Its gene *SEMA5A* is a susceptibility gene for autism, and its implications in the ENS remain largely unknown. We have shown that Sema5A regulates neuronal connectivity and synaptic activity, and a mutated version of Sema5A, associated with autism, abolishes these effects. The second project focuses on the impact of microbiota-derived secondary bile acids, which are elevated in women with ASD, on the connectivity of the ENS. This research aims to explore potential links between intestinal dysbiosis, altered bile acid metabolism, and gastrointestinal dysfunction in autism.