



**HAL**  
open science

# Le potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal : identification de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de la douleur viscérale

Sandie Gervason

## ► To cite this version:

Sandie Gervason. Le potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal : identification de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de la douleur viscérale. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC126 . tel-04649066

**HAL Id: tel-04649066**

**<https://theses.hal.science/tel-04649066>**

Submitted on 16 Jul 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.

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

**Thèse**

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne  
Pour l'obtention du grade de docteur  
(Décret du 5 juillet 1984)  
Spécialité : Microbiologie

**Soutenue le 2 décembre 2022**

**Sandie GERVASON**

---

**Le potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal :  
Identification de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le  
traitement de la douleur viscérale**

---

*Directeurs de thèse*

Dr Frédéric CARVALHO – Université Clermont-Auvergne, NeuroDol, Inserm U1107, Clermont-Ferrand  
Pr Edith FILAIRE – Université Clermont-Auvergne, ECREIN UMR1019 INRAE, Clermont-Ferrand

*Rapporteurs*

Pr Moïse COEFFIER – Université de Rouen, UFR santé, Inserm UMR1073, Rouen  
Dr Nathalie ROLHION – Centre de recherche de Saint-Antoine, UMRS938, Paris

*Examineurs*

Pr Corinne MALPUECH-BRUGERE – Université Clermont-Auvergne, UNH-UMR1019, Clermont-Ferrand  
Dr Gilles DIETRICH – Institut de recherche en santé digestive (IRSD), Inserm U1220, Toulouse

*Invité*

Dr Jean-Yves BERTHON – PDG GREENTECH SA, Saint-Beauzire

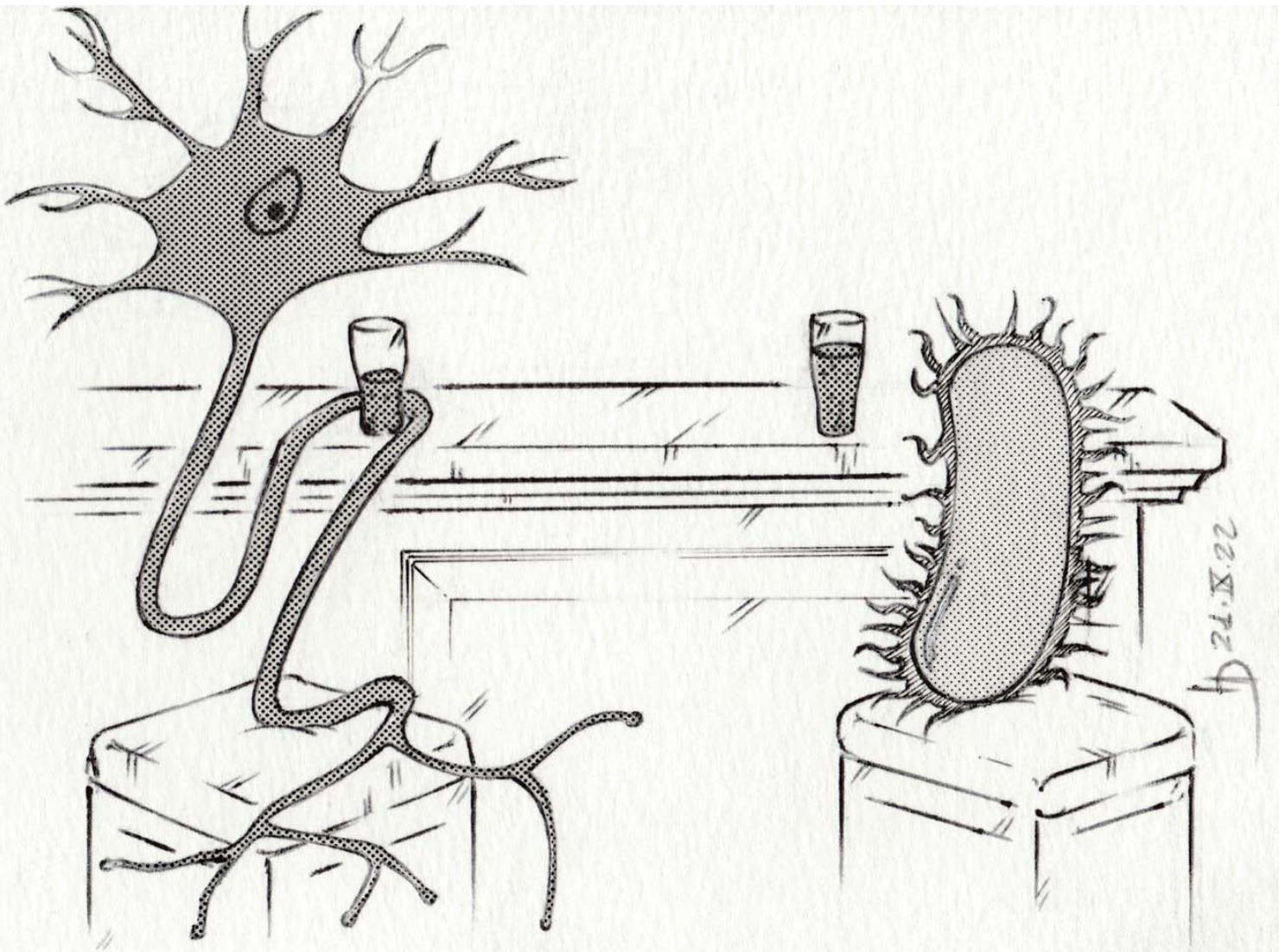
**NeuroDol UMR1107 Inserm/UCA**

Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur  
Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand  
et

**Société GREENTECH SA**

Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire





*« C'est l'histoire d'une bactérie qui parlait  
avec un neurone... »*

# Remerciements



On y est, 4 années de travail qui s'achèvent aujourd'hui. 4 années au cours desquelles j'ai eu la chance de croiser le chemin de nombreuses personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à ce travail et que je tiens à remercier. Qu'ils appartiennent à la sphère professionnelle, familiale ou amicale, chacun m'a permis d'aller au bout de ce projet qui me tenait à cœur depuis longtemps.

## Membres du Jury

Un grand merci aux membres du jury, qui ont accepté de juger mon travail en ce jour. Chacun, par sa propre expertise, contribue aujourd'hui à étendre la réflexion scientifique sur ce travail. Merci au **Pr. Moïse Coeffier** et au **Dr. Nathalie Rolhion** du temps consacré à la lecture de ce rapport. Vos retours sont précieux et contribuent à la qualité de ce manuscrit. Merci au **Pr. Corinne Malpuech-Brugère** et au **Dr. Gilles Dietrich** pour votre présence aujourd'hui. C'est un honneur.

## Membres des comités de thèse

**Dr. Nicolas Cenac**. Merci d'avoir participé à mes 3 comités de suivi de thèse, mais aussi pour vos conseils précieux et pour votre aide lors de nos quelques échanges. Merci également au **Pr. Pierre Peyret** et au **Dr. Damien Balestrino** pour votre participation aux comités de thèse, pour nos échanges constructifs aux premières étapes de ce projet. Enfin, merci au **Pr. Nicolas Barnich**, à la fois pour votre participation aux comités de thèse, mais aussi pour votre disponibilité et pour m'avoir fait confiance en me confiant les travaux dirigés de biologie moléculaire pendant 2 années consécutives. Cela m'a permis de découvrir le monde de l'enseignement et de développer de nouvelles compétences.

## Famille et amis

**Merci à vous Robert et Renée, ma famille de cœur**. C'est avec une grande émotion que je vous dédie cette thèse aujourd'hui. Vous avez cru en moi et m'avez donné les moyens de construire mon avenir, depuis le début, en m'accueillant chez vous il y a 13 ans. C'est un moment que je rêvais de partager avec vous, mes parents de cœur. Malheureusement, la vie en a décidé autrement. Cette thèse est pour vous. Vous resterez à jamais dans mon cœur...

**Merci à mon conjoint et à ses parents**. Joffre, mon chéri, tu as toujours cru en moi et tu m'as soutenu dans toutes les étapes de ce projet. La thèse n'est pas un long fleuve tranquille et pourtant, tu as toujours fait en sorte de faciliter mon quotidien. Tu as largement contribué (par tes dons « microbiologiques » et par ta présence indéfectible) à la réussite de ce projet et je t'en remercie. Ce n'est que le début de notre vie commune, une route que nous poursuivrons ensemble encore longtemps je l'espère. Merci à **Pascale** et **Yves**, vous m'avez toujours suivi dans ce projet et vous avez toujours été là, aussi bien dans les bons moments que dans les mauvais. À vous trois, merci de m'avoir aidé à prendre les bonnes décisions, je vous aime. Merci aussi à toi **Maria**, pour m'avoir soutenu dans les bons comme dans les moments difficiles.

***Merci à ma famille.*** Merci à mes sœurs, Morgane, et plus particulièrement à ***Céline*** et son compagnon ***Alex***, vous avez toujours eu conscience de l'importance que ce projet avait pour moi et vous m'avez soutenu dans les moments difficiles. Merci de m'avoir permis de m'évader le temps d'une semaine chaque été et d'être là, vous comptez beaucoup pour moi. Merci à vous Sophie, Michel, Lucas, Loris, Franck, Isabelle sans oublier Papym's pour votre soutien. J'espère vous rendre fiers.

***Merci Taous, ma sœur de cœur et à Hanin, son mari.*** Tu as sans nul doute été la plus belle rencontre que j'ai faite au cours de ces dernières années. On dit qu'on ne choisit pas sa famille, mais sache que toi, je t'ai choisie. Avec Hanin, vous avez été là, et m'avez beaucoup aidé. Je ne vous dirais jamais assez merci pour être les personnes que vous êtes. Encore de belles années d'amitiés qui nous attendent. Ne changez rien.

***Merci Margaux M. et Pierre.*** Vous avez été présents durant toutes ces années, Margaux depuis plus de 15 ans maintenant. Merci pour tous les moments partagés ensemble, pour votre présence, votre soutien et pour votre écoute. Merci de m'avoir aidé à prendre les bonnes décisions quand il le fallait. La thèse fait partie des moments importants que je voulais partager avec vous et je suis honorée de partager les vôtres.

***Merci Françoise L.*** Tu fais partie des personnes qui m'ont fait évoluer, tu as cru en moi très tôt et tu m'as donné la confiance dont j'avais besoin. Cet enseignement a été précieux, un vrai cadeau, sans lequel je ne me serais peut-être jamais lancée. J'espère te rendre fière et que notre amitié durera encore longtemps. Merci aussi à ***Karine*** et ***Sylvie*** qui m'ont formé au cours de mes premiers pas dans le monde de la recherche, des bases solides qui m'ont aidé pendant toutes ces années.

***Merci Mathilde et David.*** Une très belle rencontre et une belle amitié qui continuera aussi longtemps que possible je l'espère. Merci pour votre soutien et pour votre présence.

***Merci Hugues.*** Merci pour tes encouragements réguliers, pour ta contribution « graphique » et pour ton soutien. ***Merci JP et Jess*** pour votre présence et pour votre soutien.

***Merci Ludivine et à son compagnon Romain. Ludivine,*** merci pour ton soutien, tes encouragements et tes paroles réconfortantes. Notre amitié est nouvelle mais en peu de temps tu m'as montré que tu étais là dans les moments de doutes, dans les épreuves mais aussi dans les moments de joie, merci de m'avoir préparée et soutenue pour le concours, pour les petits apéros qui aident toujours à relâcher la pression =>).

## ***NeuroDol***

Un grand merci aux membres du laboratoire pour votre accueil, et plus particulièrement au ***Pr Radhouane Dallel***, au ***Pr Denis Ardid*** ainsi qu'au ***Dr Jérôme Busserolles***. Merci à toute l'équipe d'avoir cru en moi et de m'avoir mené jusqu'au bout de ce projet de thèse. Arrivée avec un bagage de microbiologiste, vous avez su m'accompagner et me guider dans le monde des neurosciences. Merci pour votre indulgence et pour votre patience.

***À mes directeurs de thèse : Merci Fred.*** Merci de m'avoir appris tant de choses, d'avoir pris le temps quand il le fallait et de m'avoir permis, avec ***Denis***, de poursuivre ce projet. Je suis consciente de la chance que j'ai eue et de la qualité de l'enseignement que j'ai reçu au cours de ces 4 années. Tu as cru en moi et je t'en remercie. Merci de m'avoir accompagnée quand j'en ai eu besoin, de m'avoir fait confiance et d'avoir laissé libre cours à mon imagination tout en me ramenant quand je partais trop loin dans mes réflexions scientifiques. Les compétences scientifiques et humaines acquises au cours de la thèse sont inestimables. J'ai encore une belle marge de progression devant moi (promis j'arrêterais les « on » dans mes futurs rapports), mais je suis certaine que ces 4 années m'ont fait évoluer même si je

ne comprends toujours pas pourquoi tu ne réponds pas aux mails =). Et merci d'avoir supporté mon « petit caractère ». Je n'oublie jamais les personnes qui ont cru en moi. J'ai eu la chance d'assister à ton évolution moi aussi, à ton changement de téléphone préhistorique pour un smartphone, et à tes premiers pas dans les réseaux sociaux. Un vrai « What's happeur », créateur officiel de la « team caca », un vrai moment d'émotion pour toute la team. **Merci Edith.** Merci de m'avoir accompagnée dans ce projet, d'avoir levé certains doutes et de m'avoir appris sur moi-même, de m'avoir toujours poussé à me dépasser, de m'avoir fait sortir de ma zone de confort, notamment lors de la préparation au concours MT180s. Ces 4 années ont été très enrichissantes tant personnellement que professionnellement. Grâce à vous, je me sens plus prête que jamais pour affronter le monde du travail.

**Merci Mathieu M., le roi de la débrouille, le prince du système D.** Tu as été là dès le début et tu m'as formé aux principales techniques qui m'occuperaient pendant cette thèse. Merci pour ta patience et pour ta grande pédagogie. Ta créativité, ton imagination et ta débrouillardise font de toi quelqu'un d'indispensable (et accessoirement, ont sauvé pas mal de mes journées passées en imagerie calcique =).

**Merci Laurence C.** Merci pour ton soutien, ta franchise, pour la personne que tu es, pour tes paroles réconfortantes, pour nos conversations et pour tes encouragements. Tu as été là dans les moments où je doutais le plus (le petit verre de blanc, ça fonctionne toujours =).

**Merci Julie B. et Sylvain** pour votre soutien, pour vos encouragements et votre disponibilité. Une amitié nouvelle qui se poursuivra dans les années futures je l'espère. Merci à toi Julie, d'avoir pris le temps pour m'aider à relâcher la pression. Hum, j'attends toujours mon Quiz **Sylvain**.... =)

**Merci au reste de la Team viscérale. Dr Maëva,** notre « happiness manager », merci pour ta bonne humeur, ton grain de folie au quotidien, ton expertise et ton aide, sans oublier son acolyte **Valentine**, ou « Val » pour les intimes. Une pensée également pour **Geoffroy** que j'ai eu la chance de côtoyer les 2 premières années, merci pour les conversations constructives mais aussi pour m'avoir permis de me sentir moins seule avec mes références : c'est pas faux ! =) Heureusement, **Sylvain** et **Baptiste** ont pris le relais à ton départ =).

**Merci à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ma progression.** Denis A., Stéphane L., Stéphane D., Fabien, Youssef, Jérôme, Emilie, Mélina, Guillaume, Christophe, Aurore, Agathe, Benoît, Christine, Laurence, Eric C., Eric W. et Christelle. Merci **Laetitia** et **Mireille** pour votre bienveillance et votre soutien. Merci également à Tic et Tac, et plus particulièrement à Tic (**Julien**) pour ta franchise très appréciable. **Merci à tous les doctorants pour votre soutien :** Valentine, Romane, Pauline, Baptiste, Nazarine et Alizée. Une belle équipe, toujours présente, et de grands moments de rire qui ont rendu ces derniers mois moins difficiles et à qui je souhaite le meilleur pour leur thèse. Vous allez me manquer. Et merci à toi **Margaux**, pour ta bonne humeur et tes moments de folie. Je te souhaite toute la réussite pour ta soutenance. **Enfin, je tiens à remercier les étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer,** Romane A., Nicolas D. ainsi que Maelle M. Merci pour votre aide et pour votre investissement dans ce projet dans lequel je vous ai embarqué. Je ne suis pas toujours facile à suivre et pourtant vous avez fourni un travail remarquable. À travers vos stages, je vous ai encadré du mieux que je pouvais mais le gain est partagé, vous m'avez aussi fait évoluer.

### **Greentech**

**Merci Mr Berthon.** Merci d'avoir soutenu financièrement mais aussi scientifiquement ce projet et de m'avoir fait confiance. Les années passées au sein de la société ont été très formatrices et m'ont permis de m'affirmer et de prendre de l'assurance, des qualités et des compétences que j'ai pu consolider au cours de la thèse.

**Merci Carine B.** Une très belle rencontre il y a déjà quelques années maintenant. Après une période d'apprivoisement, la découverte d'une belle amitié qui perdurera dans le temps j'en suis sûre. Merci pour ta confiance et ton soutien. Tu sais que tu pourras toujours compter sur moi. Bon, quand est-ce qu'on va courir ? =). **Merci Laetitia L.** Ma première collègue microbiologiste lors de mon arrivée, et ça ne s'oublie pas. Merci pour tout ce que tu m'as appris au cours de toutes ces années, qui ont rapidement laissé place à une belle amitié. Merci aussi pour ta confiance.

**Merci Mathieu B.** À mon arrivée, tu m'as tout appris. Le monde « magique » de la microbiologie et de la fermentation. Ne plus entendre le fameux « SAAAATIIIII !!! » quand tu arrivais en trombe dans les escaliers m'a manqué. Que de bons souvenirs, de fous rires aussi. Merci d'avoir cru en moi depuis le début. Si je devais résumer ce bon vieux temps je dirais que « tout se fermente ». Au fait, ta tasse à café est toujours sur la paillasse, et c'est quand qu'on refait de l'hydromel ? La bière ça me va aussi =)

**Merci à toi Marion N.** Ma première et super binôme de labo fermentation, nous avons partagé de super moments que je ne suis pas prête d'oublier. Que de bons souvenirs et une amitié qui dure.

**Magalie C.** Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir dans ce projet, pour tes encouragements et pour ta motivation à aller courir =). Grâce à toi et à **Carine** j'ai à peu près gardé la forme (on va dire que les derniers mois ça ne compte pas mais promis je vais m'y remettre =).

**Elise P.** Merci pour tout. Travailler avec toi a toujours été un plaisir. J'ai quelques photos souvenirs de nos moments passés en production, avec notre grosse marmite. Promis, je ne diffuse pas =), euh peut-être que si en fait, lol.

**Florelle D.** Merci pour ta bonne humeur. **Rebecca, Edwige, Maud, Jérôme, Kevin, Assia, Sophie, Christophe, Pierre, Justine, Victoria, Bertrand** mais aussi à mes collègues du Cantal, **Sandrine, Marjorie, Corinne et Rémy** et j'en oublie sûrement, je m'en excuse d'avance. Ces 5 années passées auprès de vous font partie intégrante de mon parcours, et ont contribué à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui, alors merci. Merci pour vos encouragements et pour votre professionnalisme. Je vous souhaite le meilleur et j'espère vous recroiser. Un merci tout particulier pour **Elisabeth**, qui a toujours été disponible, bienveillante et de bon conseil.

Je tiens également à remercier les personnes sollicitées au cours du projet, que je n'aurais pas encore citées, comme par exemple les membres du PRI avec une pensée toute particulière pour **Mme Magali Cordaillat-Simmons**, qui a eu la gentillesse et la patience de m'initier aux bases de la réglementation. Merci à vous et à **Mme Céline Druart** pour la clarté de la formation. Je remercie également **Mme Julie Durif**, avec qui j'ai eu la chance d'échanger à plusieurs reprises. Merci pour ton expertise, ta pédagogie et pour ta gentillesse. Et un grand merci à **Rachida Nachat-Kappes** pour tes conseils précieux et pour la formation prodiguée qui sera un outil précieux pour toutes mes futures présentations.



## Résumé

Les douleurs abdominales chroniques, un symptôme partagé par de nombreux patients atteints de pathologies gastro-intestinales comme le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) ou les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), représentent un motif de consultation récurrent en gastroentérologie et pour lesquels les traitements sont limités et souvent peu efficaces. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques constitue une priorité. Le microbiote intestinal tient une place centrale puisque les progrès en matière de séquençage ont permis de révéler une altération de sa composition chez ces patients. Alors que certaines espèces bactériennes prolifèrent, d'autres au contraire voient leur population s'effondrer et leur rôle dans la santé de l'hôte est aujourd'hui fortement envisagé. En plus de restaurer la barrière épithéliale intestinale et de moduler la réponse inflammatoire, certaines bactéries bénéfiques participent activement au dialogue « microbiote-intestin-cerveau » et pourraient, en interagissant directement avec le système nerveux, moduler le processus douloureux. Ainsi, le potentiel thérapeutique du microbiote intestinal ouvre le champ à une nouvelle classe de médicaments : les probiotiques de nouvelle génération.

Mes travaux de thèse avaient pour objectif de révéler le potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal et de sélectionner un candidat bactérien capable de réduire l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) dans plusieurs modèles murins de douleur viscérale. L'établissement d'une collection de souches anaérobies et la mise au point d'une méthode de screening à haut débit a permis, d'une part, de révéler les propriétés neuromodulatrices de souches bactériennes mais aussi de sélectionner la souche *Parabacteroides distasonis* F1-2 pour ses propriétés neuro-inhibitrices sur des cellules neuronales immortalisées mais aussi sur des cultures primaires de neurones issus de DRG de rat.

Le second objectif de ma thèse a été de déterminer si l'effet neuro-inhibiteur de la souche F1-2 pouvait se traduire par un effet anti-hyperalgique chez la souris. La souche F1-2, testée dans plusieurs modèles de douleur viscérale, exerce un effet anti-hyperalgique remarquable en réduisant l'HSVC lorsque l'intégrité de la barrière intestinale est compromise. Cependant, et contrairement à la plupart des souches probiotiques déjà connues, la souche F1-2 ne présenterait pas de propriétés anti-inflammatoires ni de renforcement de la barrière épithéliale intestinale. Ces travaux constituent la première preuve d'un potentiel effet antalgique de *P. distasonis* et les premiers résultats obtenus quant à son innocuité sont des données fortement encourageantes et permettent d'envisager son utilisation chez l'Homme.

L'hypothèse d'une interaction directe entre la souche F1-2 et les cellules neuronales est aujourd'hui suggérée et l'exploration des mécanismes d'interaction a permis de caractériser l'effet neuro-inhibiteur de la souche F1-2 sous diverses stimulations nociceptives. La possible implication de la bradykinine et/ou de ses récepteurs ouvre une nouvelle voie d'investigation dans la compréhension du dialogue établi entre bactéries et neurones.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre au point une méthode visant à sélectionner des souches bactériennes aux propriétés neuromodulatrices et de révéler le potentiel thérapeutique de la souche bactérienne *P. distasonis* F1-2 chez la souris. Il est aujourd'hui possible d'envisager son utilisation chez l'Homme en tant que probiotique de nouvelle génération destiné à soulager les patients souffrant de douleurs abdominales chroniques.

# Abstract

Chronic abdominal pain, a symptom shared by many patients with gastrointestinal pathologies such as Irritable Bowel Syndrome (IBS) or Inflammatory Bowel Diseases (IBD), is a recurring reason for consultation with Gastroenterology and for which treatments are limited and often not efficient. In this context, the development of new therapeutic strategies is a priority. The intestinal microbiota plays a key role since progress in sequencing has revealed a change in its composition in these patients. While some bacterial species proliferate, others see their populations decrease and their role in the health of the host is now strongly suggested. In addition to restoring the intestinal epithelial barrier and modulating the inflammatory response, some beneficial bacteria actively participate in the “microbiota-gut-brain” dialogue and may, by interacting directly with the nervous system, modulate the painful process. Thus, the therapeutic potential of the gut microbiota opens the field to a new class of drugs: the next generation probiotics (NGP).

My PhD work aimed to reveal the neuromodulatory potential of the gut microbiota and to select a bacterial candidate able of reducing colonic hypersensitivity (CHS) in several visceral pain mouse models. The establishment of an anaerobic bacterial strains collection and the development of a high throughput screening method made it possible to reveal the neuromodulatory properties of bacterial strains but also to select the strain *Parabacteroides distasonis* F1-2 for its neuro-inhibitory properties on immortalized neuronal cells but also on primary cultures of neurons from rat DRG.

The second objective of my thesis was to determine whether the neuro-inhibitory effect of the F1-2 strain could translate into an anti-hyperalgesic effect in mice. The F1-2 strain, tested in several CHS mouse models, exerts a remarkable anti-hyperalgesic effect when the intestinal barrier integrity was disrupted. However, and unlike most probiotic strains already known, the F1-2 strain does not exhibit anti-inflammatory properties or reinforcement of the intestinal epithelial barrier. This work is the first evidence of a potential anti-hyperalgesic effect of *P. distasonis* and the first results obtained regarding its safety are highly encouraging data to consider its use in humans.

The hypothesis of a direct interaction between F1-2 strain and neuronal cells is now suggested and the exploration of interaction mechanisms has made it possible to characterize the neuro-inhibitory effect of F1-2 strain upon various nociceptive stimulations. The possible involvement of bradykinin and/or its receptors opens a new way of investigation in understanding the dialogue established between bacteria and neurons.

Thus, this PhD work has allowed to develop a method to select bacterial strains with neuromodulatory properties and to reveal the therapeutic potential of the bacterial strain *P. distasonis* F1-2 in mice. It is now possible to consider its use in humans as a next generation probiotic intended to relieve patients suffering from chronic abdominal pain.

# Contributions scientifiques

## Articles scientifiques

---

- ♣ **Attenuation of negative effects of senescence in human skin using an extract from *Sphingomonas hydrophobicum*: development of new skin care solution.**  
S. Gervason; M. Napoli; A. Dreux-Zhiga; C. Lazzarelli; S. Garcier; A. Briand; M. Albouy; A. Thepot; J.Y. Berthon; E. Filaire. International journal of cosmetic science (2019).
- ♣ **A psychobiological approach for a positive skin aging: target senescence cells to boost emotion.**  
Sandie Gervason; Assia Dreux-Zhiga; Justine Demangeon; Carole Lazzarelli; Jean-Yves Berthon; Edith Filaire. International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) (2019).
- ♣ **Rhodomlyrtus tomentosa fruit extract and skin microbiota: a focus on *C. acnes* phylotypes in acne subjects.**  
S. Gervason; I. Metton; E. Gemrot; E. Ranouille; G. Skorski; M. Cabannes ; J.Y. Berthon; E. Filaire. Cosmetics (2020).
- ♣ **Serpin-positive *Bifidobacterium breve* CNCM I-5644 improves intestinal permeability in two models of irritable bowel syndrome**  
E. Torres-Maravilla; S. Holowacz; J. Delannoy; L. Lenoir; E. Jacouton; S. Gervason; M. Meynier; A.S. Boucard; F. Carvalho; F. Barbut; L.G. Bermudez-Humaran; P. Langella ; A.J. Waligora-Dupriet. Scientific Reports (2022).
- ♣ **Anti-hyperalgesic properties of gut microbiota: *Parabacteroides distasonis* as a new probiotic strategy to alleviate chronic abdominal pain.**  
S. Gervason; Mathieu Meleine; Stéphane Lolignier; Maëva Meynier; Jean-Yves Berthon; Denis Ardid; Edith Filaire; Frédéric Antonio Carvalho – en cours de soumission (2022)

## Brevet

---

- ♣ ***Parabacteroides distasonis* strain isolated from human feces and applications thereof (BREVET)**  
Submission number: 10818678 / Application number: EP22166365 / File No. to be used for priority declarations: EP22166365 / Date of receipt: 01 April 2022 / Reference: GRH B001 EP1 / Applicant : GREENTECH  
Inventeurs : Sandie GERVASON, Edith FILAIRE, Jean-Yves BERTHON, Frédéric CARVALHO. Statut : accepté – couverture géographique : Europe.

## Revue scientifique

---

### ♣ **Microbiota: a novel regulator of pain.**

M. Defaye and **S. Gervason**; C. Altier; J.Y. Berthon; D. Ardid; E. Filaire; F. Carvalho. Journal of neural transmission (2019).

### ♣ **Influence du microbiote sur la douleur.**

**S. Gervason**; M. Defaye; D. Ardid; J.Y. Berthon; C. Altier; E. Filaire; F. Carvalho. Douleur et Analgésie (2021).

## Communications orales

---

### *Congrès internationaux*

#### ♣ ***Lactobacillus pentosus* extract: effect on host defense stimulation and skin microbiota**

Congrès : 10th International conferences on skin ageing and challenges  
Date : février 2019  
Lieu : Porto (PORTUGAL)  
Langue : anglais

#### ♣ **Strict anaerobic bacteria involvement in gut-brain axis: a novel regulator of pain and well-being.**

Congrès : Targeting microbiota  
Date : octobre 2019  
Lieu : Cracovie (POLOGNE)  
Langue : anglais

### *Congrès/Évènements français*

#### ♣ **Le microbiote comme acteur de régulation de la douleur : Implications fonctionnelles sur le comportement et le "bien-être" de la souris.**

Congrès : Journées de l'Université d'été CRNH  
Date : septembre 2019  
Lieu : Clermont-Ferrand (FRANCE)  
Langue : français

♣ **Les nouveaux probiotiques : grandes avancées et autres solutions de modulation du microbiote intestinal.**

Congrès : Journées probiotiques et microbiote intestinal « by Lyonbiopôle »

Date : février 2020

Lieu : Lyon (FRANCE)

Langue : français

♣ **Once upon a time: the microbiome.**

Évènement : Webinaire (diffusion directe à l'international)

Date : avril 2020

Lieu : Société GREENTECH – Saint-Beauzire (FRANCE)

Langue : anglais

♣ **Strict anaerobic bacteria involvement in pain and well-being: novel probiotics strategies for the modulation of the gut-brain axis.**

Évènement : Journées de l'école doctorale

Date : mai 2021

Lieu : Clermont-Ferrand (FRANCE)

Langue : anglais

♣ **Le potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal : identification de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la régulation de la douleur viscérale.**

Congrès : Journées du Groupe Français de NeuroGastroentérologie

Date : juin 2021

Lieu : Rennes (FRANCE)

Langue : français

## Communication affichée

---

♣ **Strict anaerobic bacteria involvement in pain and well-being: Novel probiotics strategies for the modulation of the gut-brain axis.**

Congrès : 4<sup>th</sup> meeting of the Federation of Neurogastroenterology and Motility (FNM)

Date : avril 2021.

Lieu : Adelaïde (AUSTRALIE) – suivi en distanciel à Clermont-Ferrand (FRANCE)

Langue : anglais

## Concours

---

### ♣ “Ma thèse en 180 secondes”

Clermont-Ferrand le 24/03/2022

Prix remporté : 2ème prix du jury

Participation à la demi-finale nationale (Paris) (7-9 avril 2022)

Lien : [XXXXXXXXXX ? ? XXXXXXXXXXXXXXXX ?? XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXX](#)

## Missions d’enseignement et encadrement de stages

---

### Missions d’enseignement

---

#### ♣ **Enseignante contractuelle**.....*Année universitaire 2020-2021*

Travaux dirigés de biologie moléculaire (32h)

DUT Génie biologique (étudiants de 1<sup>ère</sup> année)

Institut universitaire Technologique, Clermont-Ferrand

#### ♣ **Enseignante contractuelle**.....*Année universitaire 2021-2022*

Travaux dirigés de biologie moléculaire (20h)

DUT Génie biologique (étudiants de 1<sup>ère</sup> année)

Institut universitaire Technologique, Clermont-Ferrand

### Missions d’encadrement

---

#### ♣ **Tutrice Projets tutorés** (équivalent 3h).....*Année universitaire 2021-2022*

DUT Génie biologique (étudiants de 2<sup>ème</sup> année)

Institut universitaire Technologique, Clermont-Ferrand

## Encadrement de stages

---

- ♣ **Marine BESSON**.....*Année universitaire 2019-2020*  
Formation : STS Biotechnologies (Lycée Simon Weil – Puy en Velay)  
Durée : 2 mois  
Intitulé du stage : « Isolement de souches anaérobies strictes et évaluation de leur potentiel antalgique »
  
- ♣ **Romane ARNOULD**.....*Année universitaire 2019-2020*  
Formation : Licence Professionnelle Études Moléculaires et Intégrées des Molécules Bio-actives (étudiante de 3<sup>ème</sup> année)  
Durée : 14 semaines  
Intitulé du stage : « Évaluation des propriétés neuromodulatrices de bactéries anaérobies strictes isolées de fèces »
  
- ♣ **Nicolas DUMAIRE**.....*Année universitaire 2020-2021*  
Formation : Master 1 Sciences du médicament  
Durée : 2 mois  
Intitulé du stage : « Évaluation du potentiel neuro-inhibiteur d'une souche commensale intestinale anti-nociceptive »
  
- ♣ **Maëlle MONFREUX**.....*Année universitaire 2021-2022*  
Formation : 3<sup>ème</sup> année de médecine – Master 1  
Durée : 2 mois  
Intitulé du stage : « Évaluation préliminaire de l'innocuité d'une souche commensale intestinale aux propriétés antalgiques démontrées »

# SOMMAIRE

---

## *Chapitre I : Rôle du microbiote intestinal dans la douleur et dans les troubles anxio-dépressifs.*

---

<b>1. Le microbiote intestinal.....</b>	<b>1</b>
1.1. Composition et diversité du microbiote intestinal.....	1
1.2. Évolution du microbiote intestinal.....	2
1.3. Rôles du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte.....	3
1.3.1. Rôle dans la digestion.....	3
1.3.2. Rôle dans la fonction barrière.....	4
1.3.3. Développement et maturation du système immunitaire.....	4
1.3.4. Développement et maturation du système nerveux.....	6
1.4. Eubiose, dysbiose et résilience du microbiote intestinal.....	7
<b>2. Dysbiose du microbiote intestinal associée à des douleurs chroniques.....</b>	<b>8</b>
2.1. Physiologie de la douleur.....	8
2.1.1. Définitions et composantes de la douleur.....	8
2.1.2. Le processus douloureux.....	10
2.2. Dysbiose du microbiote intestinal associée à des douleurs abdominales chroniques.....	11
2.2.1. Le syndrome de l'intestin irritable.....	11
2.2.1.1. Physiopathologie du syndrome de l'intestin irritable.....	11
2.2.1.2. Syndrome de l'intestin irritable et dysbiose du microbiote intestinal.....	12
2.2.1.3. Traitements du syndrome de l'intestin irritable.....	14
2.2.2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....	14
2.2.2.1. Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales.....	14
2.2.2.2. Maladies inflammatoires chroniques intestinales et dysbiose du microbiote intestinal.....	16
2.2.2.3. Traitements des maladies inflammatoires chroniques intestinales.....	17
2.3. Dysbiose du microbiote intestinal associée à des douleurs chroniques extra-intestinales.....	17
2.3.1. La migraine.....	18
2.3.2. La fibromyalgie.....	19
2.3.3. Les neuropathies périphériques causées par la chimiothérapie.....	19
<b>3. Troubles anxio-dépressifs associés à une dysbiose du microbiote intestinal.....</b>	<b>21</b>
3.1. Les troubles anxio-dépressifs.....	21
3.2. Implication du microbiote intestinal dans les troubles anxio-dépressifs.....	21
3.3. Implication de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans le développement de troubles anxio-dépressifs.....	23



3.3.1. Voies de communication empruntées par le microbiote intestinal.....	23
3.3.2. Implication des métabolites bactériens.....	24
3.3.3. Modulation de la voie de l'inflammation.....	25
3.3.4. Modulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien dans le développement de trouble anxio-dépressif.....	27
3.4. Dysbiose intestinale, trouble anxio-dépressif et douleurs viscérales.....	28
<b>4. Synthèse du chapitre I.....</b>	<b>30</b>

---

## *Chapitre II*

### *Les propriétés neuromodulatrices du microbiote : un dialogue bactérie-neurone complexe.*

---

<b>1. Voies nerveuses impliquées dans la douleur viscérale.....</b>	<b>31</b>
1.1. L'innervation intestinale.....	31
1.1.1. Le système nerveux entérique.....	31
1.1.2. L'innervation intestinale extrinsèque.....	32
1.2. Le concept d'hypersensibilité viscérale.....	34
1.3. Les récepteurs impliqués dans la douleur viscérale.....	35
1.3.1. Les récepteurs Transcient receptor potentiel (TRP).....	36
1.3.2. Les récepteurs à la sérotonine.....	38
1.3.3. Les récepteurs à l'histamine.....	39
1.3.4. Les récepteurs à la bradykinine.....	40
1.3.5. Les récepteurs activés par des protéases.....	42
1.3.6. Les récepteurs à l'acide gamma aminobutyrique (GABA).....	43
1.3.7. Autres récepteurs impliqués dans la douleur viscérale.....	44
<b>2. Interactions bactérie-neurone : un dialogue complexe.....</b>	<b>44</b>
2.1. Une communication directe <i>via</i> des éléments constitutifs de la paroi.....	45
2.1.1. Les lipopolysaccharides.....	45
2.1.2. Les peptides N-Formylés.....	46
2.1.3. La flagelline.....	46
2.2. Une communication directe <i>via</i> des métabolites bactériens sécrétés.....	47
2.2.1. Les acides gras à chaînes courtes.....	47
2.2.2. Les métabolites de la voie du tryptophane.....	48
2.2.3. Les neurotransmetteurs.....	49
2.2.4. Les protéases à sérine.....	50
<b>3. Exemples de modulation de la douleur par le microbiote.....</b>	<b>51</b>



3.1. Propriétés pro-nociceptives de souches microbiennes.....	51
3.2. Propriétés anti-nociceptives de souches microbiennes.....	53
<b>4. Synthèse du chapitre II.....</b>	<b>56</b>

---

*Chapitre III : La modulation du microbiote intestinal comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de la douleur viscérale.*

---

<b>1. Stratégie pharmacologique du traitement de la douleur viscérale.....</b>	<b>57</b>
1.1. Agents antispasmodiques.....	57
1.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens et le paracétamol.....	58
1.3. Régulateurs du transit intestinal.....	58
1.4. Antidépresseurs.....	59
<b>2. La modulation du microbiote intestinal comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de la douleur viscérale.....</b>	<b>59</b>
2.1. Le régime alimentaire.....	59
2.2. La transplantation de microbiote fécal.....	61
2.3. La phagothérapie.....	63
2.4. Les produits dits « biotiques ».....	65
2.4.1. Les probiotiques.....	65
2.4.2. Les prébiotiques.....	67
2.4.3. Les symbiotiques.....	68
2.4.4. Les parabiotiques.....	69
2.4.5. Les postbiotiques ou métabiotiques.....	70
<b>3. Identification de probiotiques de nouvelle génération aux propriétés antalgiques pour le traitement des douleurs viscérales.....</b>	<b>71</b>
3.1. Isolement et identification des candidats bactériens.....	71
3.2. Évaluation des propriétés neuromodulatrices <i>in vitro</i> .....	71
3.3. Évaluation des propriétés antalgiques <i>in vivo</i> : utilisation de modèles animaux de douleur viscérale.....	73
3.3.1. Modèle de douleur inflammatoire : Dextran Sulfate Sodium.....	74
3.3.2. Modèle de douleur post-inflammatoire : DNBS et TNBS.....	74
3.3.3. Modèle de stress par séparation maternelle : NMS.....	75
3.3.4. Modèle post-infectieux.....	76
3.3.4.1. <i>Citrobacter rodentium</i> .....	76



3.3.4.2. <i>Trichinella spiralis</i> .....	77
<b>4. Les candidats bactériens dans le traitement de la douleur viscérale.....</b>	<b>77</b>
4.1. Les probiotiques régulateurs du transit intestinal.....	78
4.2. Les probiotiques aux propriétés antalgiques.....	79
4.2.1. <i>Les probiotiques conventionnels aux propriétés antalgiques</i> .....	79
4.2.2. <i>Les probiotiques de nouvelle génération aux propriétés antalgiques</i> .....	80
<b>5. Limites réglementaires liées à l'utilisation des probiotiques de nouvelle génération en santé humaine.....</b>	<b>82</b>
5.1. Définition du statut réglementaire d'un produit.....	83
5.1.1. <i>Les compléments alimentaires</i> .....	83
5.1.2. <i>Les nouveaux médicaments</i> .....	84
5.2. Limites réglementaires représentées par les LBPs.....	85
5.3. Évolution de la réglementation.....	86
<b>6. Synthèse du chapitre III.....</b>	<b>88</b>
<hr/>	
<i>Objectifs et stratégie expérimentale</i> .....	<b>89</b>
<i>Données expérimentales</i> .....	<b>91</b>
Article 1.....	91
Données complémentaires.....	109
1. <i>Exploration du mécanisme moléculaire impliqué dans l'effet neuromodulateur entre P. distasonis FI-2 et les cellules neuronales</i> .....	110
2. <i>Étude de l'innocuité de la souche Parabacteroides distasonis FI-2</i> .....	117
3. <i>Anabiotics : Constitution d'une banque de souches bactériennes commensales intestinales et évaluation de leurs propriétés neuromodulatrices</i> .....	123
<b>Discussion/Perspectives.....</b>	<b>130</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>142</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>143</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>162</b>

# Liste des abreviations

**$\alpha$ -HL** : *alpha Hemolysin*

**4 $\alpha$ PDD** : *4 $\alpha$ -Phorbol 12,13-DiDecanoate*

**5-ASA** : *5-AminoSalicylates*

**5-HT** : *5-HydroxyTryptamine* ou *sérotinine*

**5,6-EET** : *acide EpoxyEicosaTrienoique*

**12(S)HETE** : *acide 12(S)-HydroxyEicosaTetraÉnoique*

## A

**ACTH** : *AdrenoCorticoTropic Hormone*

**Ach** : *AcétylCholine*

**ADAM10** : *A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10*

**AEEC** : *Attaching and Effacing Escherichia Coli*

**AGCC** : *Acides Gras à Chaînes Courtes*

**AIEC** : *Adherent-Invasive Escherichia Coli*

**AINS** : *Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens*

**AMM** : *Autorisation de Mise sur le Marché*

**AMP** : *Adénosine MonoPhosphate*

**ANSES** : *Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail*

**ANSM** : *Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé*

**ATP** : *Adenosine TriPhosphate*

**AT2R** : *AngioTensin II type 2 Receptor*

**ASIC** : *Acid-Sensing Ion Channel*

## B

**BBA** : *Blood Brain Agar*

**BDNF** : *Brain Derived Neurotrophic Factor*

**BHE** : *Barrière Hémato Encéphalique*

**BR** : *Bradykinin Receptor*

## C

**Cas** : *CRISPR ASsociated protein*

**CCL2** : *C-C motif Chemokine Ligand 2*

**CD** : *Cellules Dendritiques*

**cGMP** : *Cyclic Guanosine MonoPhosphate*

**CGRP** : *Calcitonin Gene Related Peptide*

**COX-2** : *CycloOxygenase 2*

**CRH** : *Corticotropin-Releasing Hormone*

**CRISPR** : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

**CTX** : *Cyclophosphamide*

## D

**DAG** : *DiAcyl Glycerol*

**Darc** : *Duffy Antigen Receptor for Chemokines*

**DCR** : *Distension ColoRectale*

**DNBS** : *DiNitroBenzen Sulfonic acid*

**DRG** : *Dorsal Root Ganglia*

**DSM-IV** : *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 1994*

**DSS** : *Dextran Sulfate Sodium*

**DW** : *Deep-Well*

## E

**EAEC** : *EnteroAggregative Escherichia Coli*

**EDTA** : *EthylèneDiamineTétraAcétique*

**EFSA** : *European Food Safety Authority*

**EPM** : *ExoPolysaccharides Membranaires*

**EPM** : *Elevated Plus Maze*

## F

**FDA** : *Food Drug Administration*

**fMIFL** : *peptide N-Formyl-Met-Ile-Phe-Leu*

**fMLF** : *peptide N-Formyl-Met-Leu-Phe*

**FFAR3** : *Free Fatty Acid Receptor 3*

**FODMAP** : *Fermentable Oligo-, Di-, Monosaccharides And Polyols*

**FOS** : *FructoOligoSaccharides*

**FPR** : *Formyl Peptide Receptor*

## G

**GABA** : *Gamma AminoButyric Acid*

**GABA<sub>A/B</sub>** : Récepteurs au GABA

**GAD** : *Glutamate Decarboxylase*

**GAM** : *Gam Agar Modified*

**GMP** : *Good Manufacturing Practices*

**GN** : Ganglion Nouveau

**GOS** : GalactoOligoSaccharides

**GPR35** : *G Protein-coupled Receptor 35*

**GPR41** : *G-Protein coupled Receptor 41*

**GRAS** : *Generally Recognized As Safe*

## H

**HIR** : *Histamine Receptor 1*

**HADS** : *Hospital Anxiety and Depression Scale*

**HHC** : Hypothalamo-Hypophysio-Corticosurrénalien

**HHS** : Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien

**HMP** : *Human Microbiome Project*

**HPLC** : *High Performance Liquid Chromatography*

**HSVC** : HyperSensibilité Viscérale d'origine Colique

## I

**IASP** : *International Association for the Study of Pain*

**IDO** : Indoléamine 2,3-DiOxygénase

**IFN- $\gamma$**  : InterFéron gamma

**IgA** : ImmunoGlobuline A

**IgG** : ImmunoGlobulines G

**IL** : InterLeukine

**IP3** : *Inositol 1,4,5-TrisPhosphate*

**IPAN** : *Intrinsic Primary Afferent Neurons*

## K

**KYNA** : *KYNurenic Acid*

## L

**LBM** : *Live Biotherapeutic Microorganism*

**LBP** : *Live Biotherapeutic Product*

**LPS** : LipoPolySaccharide

**LTA** : LipoTeichoic Acid

## M

**MAM** : *Microbial Anti-inflammatory Molecule*

**MAPK** : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MC** : Maladie de Crohn

**MCP-1** : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

**MetaHit** : *METAgenomics of the Human Intestinal Tract*

**MICI** : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

## N

**NAID** : *NOD2-associated AutoInflammatory Disease*

**NALP/NLRP** : *Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeats and Pyrin domain containing*

**NF- $\kappa$ B** : *Nuclear Factor kappa B*

**NGP** : *Next-Generation Probiotics*

**NLR** : *Nucleotide oligomerization domain Receptor*

**NLR** : *Novel Location Recognition*

**NLR C4** : *NOD Like Receptor family CARD domain containing protein 4*

**NMDA** : N-Méthyl-D-Aspartate

**NMS** : *Neonatal Maternal Separation*

**NO** : *Nitric-Oxide*

**NOD2** : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2*

**NOR** : *Novel Object Recognition*

**NPC** : Neuropathies Périphériques causées par la Chimiothérapie

**NTS** : Noyau du Tractus Solitaire

## P

**P1/P2Y/P2X** : *Purinergic receptors*

**PAMP** : *Pathogen Associated Molecular Patterns*

**PAR** : *Protease Activated Receptor*

**PFA** : ParaFormAldehyde

**PFT** : *Pore Forming Toxins*

**PIP2** : *PhosphatidylInositol-4,5-bisPhosphate*

**PKA** : Protéine Kinase A

**PKC** : Protéine Kinase C

**PLC** : PhosphoLipase C

**PPAR $\gamma$**  : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*

**PRI** : *Pharmabiotics Research Institute*

**PRR** : *Pattern Recognition Receptors*

**PSA** : PolySaccharide A

**PSM** : *Phenol-Soluble Modulin*

**PTX** : *Pertussis ToXine*

**PVN** : *ParaVentricular Nucleus*

## Q

**QPS** : *Qualified Presumption of Safety*

**QUIN** : acide QUINnolinique

## R

**RCH** : ReCtocolite Héorragique

**RCPG** : Récepteur Couplé aux Protéines G

**RLR** : *RIG-I Like Receptor*

**ROS** : *Reactive Oxygen Species*

## S

**SHIME** : *Simulated Human Intestinal Microbial Ecosystem*

**SII** : Syndrome de l'Intestin Irritable

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

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

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

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

**SII-QoL** : Qualité de vie moyenne en lien avec le SII

**SII-SSS** : Score moyen de sévérité du SII

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

**SL-1** : *Glycolipid SulfoLipid-1*

**SLS** : StreptoLysin S

**SNC** : Système Nerveux Central

**SNE** : Système Nerveux Entérique

**SP** : Substance P

## T

**TG** : *Trigeminal Ganglia*

**TGI** : Tractus Gastro-Intestinal

**Th** : Lymphocytes T helper

**TIM** : *TNO Intestinal Model*

**TLR** : *Toll-Like Receptor*

**TMF** : Transplantation de Microbiote Fécal

**TNBS** : *2,4,6-TriNitroBenzene Sulphonic acid*

**TNF- $\alpha$**  : *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*

**TRAAK** : *TWIK-Related Arachidonic Acid activated K<sup>+</sup> channel*

**Treg** : Lymphocytes T régulateurs

**TRPA1** : *Transcient Receptor Potential cation channel subfamily A member 1*

**TRPM 8** : *Transcient Receptor Potential Melastatin member 8*

**TRPV1** : *Transcient Receptor Potential Vanilloid type 1*

**TRPV4** : *Transcient Receptor Potential Vanilloid type 4*

## U

**UV** : Ultra-Violets

**UFC** : Unité Formant Colonie

## V

**VIP** : *Vasoactive Intestinal Peptide*

# Revue bibliographique





---

# Chapitre I : Rôle du microbiote intestinal dans la douleur et dans les troubles anxio-dépressifs

---

?

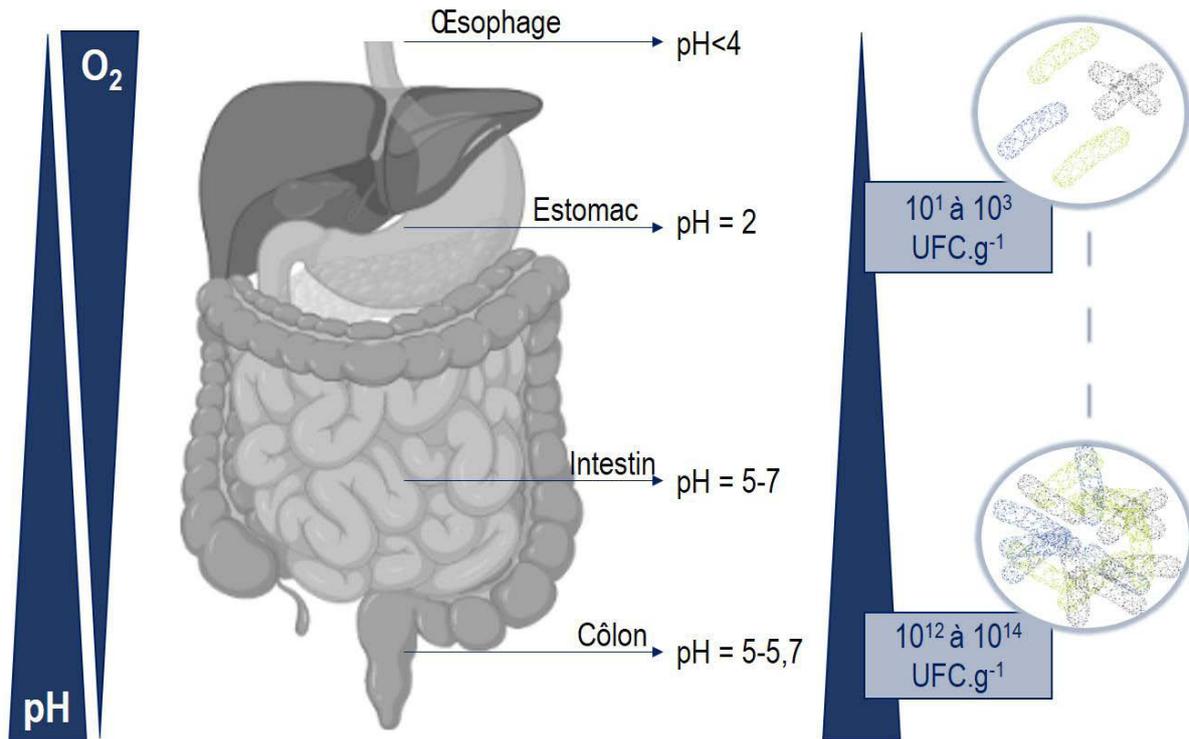
?

## 1. Le microbiote intestinal

### 1.1. Composition et diversité du microbiote intestinal

Le terme microbiote désigne l'ensemble des microorganismes colonisant un écosystème. L'Homme abrite plusieurs microbiotes selon le site corporel considéré comme le microbiote cutané, le microbiote pulmonaire ou encore le microbiote intestinal. Les progrès technologiques permettent aujourd'hui d'accéder à la composition de ces microbiotes et de mieux comprendre leur fonction dans la santé de l'hôte. L'organisme comporte plus de cellules microbiennes que de cellules humaines, avec un ratio de 1,3 cellules microbiennes pour 1 cellule humaine (Sender *et al.*, 2016). La diversité génétique retrouvée chez l'Homme est dominée par des gènes microbiens puisqu'ils représentent 99% du génome (Qin *et al.*, 2010b). Parmi l'ensemble des microbiotes identifiés à ce jour, le microbiote intestinal est certainement l'un des plus étudié. En effet, il suscite un vif intérêt dans la communauté scientifique qui cherche à mieux comprendre son rôle dans la santé humaine (Alonso and Guarner, 2013).

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des microorganismes colonisant le tractus gastro-intestinal (TGI). Il se compose principalement de bactéries, mais comprend également d'autres microorganismes tels que des champignons, des archées, des virus ou encore des protozoaires (Sekirov *et al.*, 2010). Les virus tiennent une place importante au sein du microbiote intestinal puisque leur abondance serait équivalente à celle des bactéries (Ogilvie and Jones, 2015). La flore bactérienne est aujourd'hui la plus étudiée. Sa composition a été rendue accessible grâce à de nombreux projets de séquençage tels que le projet européen « Metagenomic of the Human Intestinal Tract » (MetaHit, 2008-2012), le projet « American Gut Project » (HMP, 2008) ou encore le « British Gut Project » (2014). La charge bactérienne évolue le long du tractus digestif. Alors qu'elle est relativement faible au niveau de l'estomac ( $10^1$  UFC.g<sup>-1</sup>), celle-ci s'enrichit jusqu'à atteindre une forte densité comprise entre  $10^{12}$  UFC.g<sup>-1</sup> et  $10^{14}$  UFC par gramme de selles au niveau du côlon.



**Figure 1 : Évolution de la charge bactérienne le long du tractus digestif en fonction des conditions physicochimiques (pH et teneur en oxygène).**

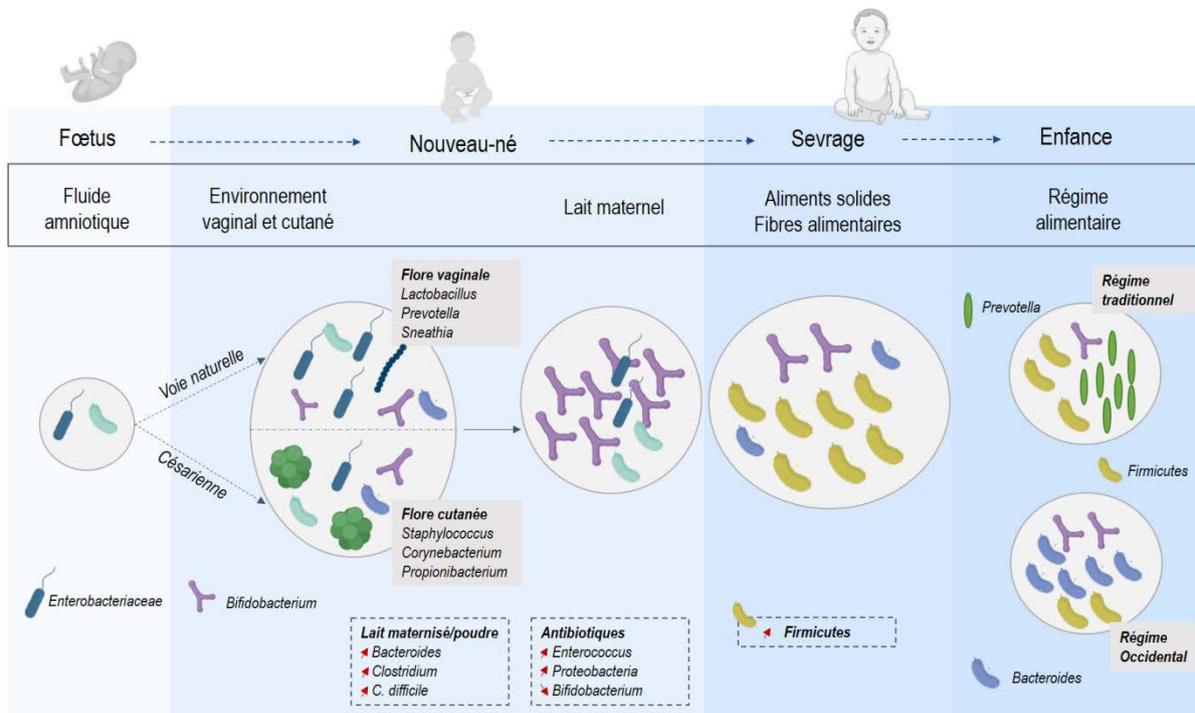
Phylum	Classe/ordre/famille	Genre	Espèce
<b>Firmicutes</b> 60% - 80%		<i>Clostridium</i> <i>Faecalibacterium</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Roseburia</i>	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Roseburia hominis</i>
<b>Bacteroidetes</b> 20% - 40%		<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Parabacteroides</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Prevotella copri</i> <i>Parabacteroides distasonis</i>
<b>Actinobacteria</b>		<i>Bifidobacterium</i> <i>Atopobium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Atopobium parvulum</i>
<b>Proteobacteria</b>		<i>Escherichia</i> <i>Hafnia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Serratia</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

**Figure 2 : Classification et composition générale du microbiote intestinal.** Le microbiote intestinal est composé de nombreux microorganismes : levures, champignons, virus et bactéries. Les bactéries appartiennent à différents sous-ensembles de groupes bactériens (phyla). Les bactéries intestinales, et plus particulièrement celles retrouvées au niveau du côlon, appartiennent à 4 phyla majoritaires : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria qui regroupent plusieurs familles bactériennes dans lesquelles sont retrouvées différents genres bactériens puis des espèces. Adapté de Gervason *et al.*, (2021).

Ces variations d'abondance sont en lien direct avec les gradients de pH et d'oxygène retrouvés le long du tractus digestif et qui influenceront également sa composition (**Figure 1**). L'analyse de sa composition révèle la présence de 4 phyla majoritaires représentant plus de 90% du microbiote bactérien (Hugon *et al.*, 2015) : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria alors que les bactéries appartenant aux phyla Fusobacteria et Verrucomicrobia sont retrouvées en plus faible abondance (Eckburg *et al.*, 2005). Chacun de ces phyla renferme un grand nombre d'espèces bactériennes (**Figure 2**). Le microbiote intestinal est cependant caractérisé par une variabilité inter-individuelle. Malgré cela, l'existence de 3 entérotypes se distinguant par une forte abondance de bactéries appartenant aux genres *Bacteroides*, *Ruminococcus* ou *Prevotella* a été proposée (Arumugam *et al.*, 2011).

## 1.2. Évolution du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal colonise le TGI, dès la naissance, et entretient une relation étroite avec l'hôte et son système immunitaire. Contrairement à ce qu'on a longtemps pensé, le nourrisson serait en contact avec des bactéries commensales contenues dans le placenta de la mère, participant ainsi au développement de son système immunitaire pendant la vie fœtale (Aagaard *et al.*, 2014). Ces données sont toutefois controversées à l'heure actuelle (Perez-Muñoz *et al.*, 2017). En revanche, il est bien établi que l'étape de colonisation du tube digestif débute dès la naissance. Cette période est cruciale pour l'implantation d'un microbiote sain qui jouera également un rôle dans le développement du nourrisson. Sa composition dépend du mode d'accouchement. En effet, un accouchement par voie naturelle favorise la colonisation par des espèces bactériennes appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* caractéristiques du microbiote vaginal de la mère. Ce microbiote diffère lorsque l'accouchement est réalisé par césarienne puisqu'il se compose essentiellement de bactéries appartenant aux genres *Staphylococcus* et *Corynebacterium*, caractéristiques du microbiote cutané (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Cette colonisation suit **la théorie des 1000 premiers jours**, une période cruciale au cours de laquelle le microbiote intestinal colonise le TGI et se diversifie peu à peu (Robertson *et al.*, 2019). Il semblerait qu'un microbiote riche en bifidobactéries confère un avantage au nouveau-né puisqu'elles préviendraient du développement de diverses pathologies telles que l'obésité, les diabètes ou les troubles métaboliques, mais aussi de l'asthme et des allergies (Johnson and Ownby, 2017; Stuivenberg *et al.*, 2022). La nutrition et l'environnement du nouveau-né sont des facteurs participant à la diversification et à la maturation du microbiote.



**Figure 3 : Étapes de colonisation du microbiote intestinal au cours de la vie, de la naissance à l'adolescence.** La diversité du microbiote intestinal apparaît progressivement au cours des premiers mois et des premières années de la vie et sa composition est impactée par plusieurs facteurs comme le mode d'accouchement, l'allaitement, l'introduction d'aliments solides dans l'alimentation ou encore le régime alimentaire à l'adolescence. Adapté de Tanaka and Nakayama (2017).

L'introduction d'aliments solides constitue une étape importante dans la mise en place d'un microbiote mature puisqu'elle favorise le développement de souches bactériennes anaérobies capables de digérer les fibres alimentaires. Les bifidobactéries laissent peu à peu la place à des bactéries appartenant aux Firmicutes et aux Bacteroidetes, les 2 phyla majoritairement retrouvés chez l'adulte. Le développement de bactéries anaérobies conduit à la production de métabolites tels que les acides gras à chaînes courtes (AGCC). Ainsi, le microbiote évolue tout au long de la vie, mais les premières étapes survenant dans les premiers mois semblent déterminantes pour la santé de l'hôte (**Figure 3**).

### 1.3. Rôles du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte

#### 1.3.1. Rôle dans la digestion

La fonction de digestion assurée par le microbiote intestinal est le résultat d'une relation symbiotique entretenue avec son hôte. En effet, alors que le microbiote intestinal puise son énergie en digérant les aliments et plus particulièrement les fibres et les résidus alimentaires non digestibles par l'Homme, comme l'amidon ou les polysaccharides, il fournit à son tour des éléments essentiels tels que des acides aminés ou encore des AGCC comme l'acétate, le propionate et le butyrate. Ce dernier constitue une véritable source d'énergie pour les colonocytes et contribue au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal (Donohoe *et al.*, 2011). Cette digestion facilite l'assimilation des différents nutriments libérés. Le microbiote colique est impliqué dans le métabolisme des glucides et des protéines mais aussi dans la synthèse de vitamines comme la vitamine K et les vitamines du groupe B (B1, B8, B9 et B12) (Hill, 1997) et dans la biotransformation des acides biliaires (Singh *et al.*, 2019). Ces activités sont assurées par les propriétés saccharolytiques et protéolytiques des espèces bactériennes présentes au niveau du côlon. Certains membres du microbiote participent à un phénomène de « cross-feeding », autrement dit, un processus d'alimentation métabolique croisée, assurant aux différentes espèces bactériennes une bonne croissance et une bonne résilience en cas de carence alimentaire. Dans cette relation syntrophique, certaines bactéries produisent des métabolites qui seront à leur tour pris en charge par d'autres membres du microbiote. Par exemple, l'acétate produit par certaines bactéries est pris en charge et transformé en butyrate par les espèces *Faecalibacterium prausnitzii* et *Roseburia sp.* (Duncan *et al.*, 2004). Cette relation syntrophique est également retrouvée entre les espèces *Bacteroides thetaiotaomicron* et *F. prausnitzii*. Ces deux espèces bactériennes sont ainsi métaboliquement complémentaires (Wrzosek *et al.*, 2013).



### *1.3.2. Rôle dans la fonction barrière*

La barrière épithéliale intestinale représente la première ligne de défense contre l'entrée de microorganismes pathogènes. En effet, au-delà de participer activement à l'absorption des nutriments et des électrolytes, elle constitue une véritable interface au sein de laquelle a lieu une lutte constante contre l'entrée de microorganismes en transit au sein du TGI (Farhadi *et al.*, 2003). Cette barrière physique travaille de concert avec le système immunitaire afin de distinguer les différents antigènes circulants dans la lumière intestinale. Le microbiote intestinal contribue largement à maintenir cette barrière physique et va agir à différents niveaux. Lorsque sa composition est optimale, le microbiote limite l'attachement et l'invasion de pathogènes au niveau de l'épithélium, notamment en stimulant la production de mucus (Johansson *et al.*, 2015; Petersson *et al.*, 2011), mais également en occupant les sites d'adhésion et en établissant une relation de compétition pour l'espace et les nutriments. Il peut aussi agir en modifiant le niveau d'expression et la distribution des protéines de jonction serrées (claudine, occludine et zonula occludens) assurant ainsi une perméabilité intestinale optimale (Ulluwishewa *et al.*, 2011) et limitant les phénomènes de translocation bactérienne (Takiishi *et al.*, 2017). De plus, il peut interagir directement avec les pathogènes ou bien indirectement en modulant la réponse immunitaire (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004).

### *1.3.3. Développement et maturation du système immunitaire*

L'acquisition d'un système immunitaire mature survient au cours des premières années de la vie. En effet, le nouveau-né présente un système immunitaire différent de celui de l'adulte puisque certains aspects de l'immunité innée et adaptative ne sont pas totalement fonctionnels. La faible exposition aux antigènes rend le système immunitaire immature. Une période d'adaptation est donc requise. Cette période va de pair avec celle de la colonisation du TGI par le microbiote intestinal. En effet, au cours de sa maturation, le système immunitaire doit limiter la réponse inflammatoire dirigée contre les bactéries commensales colonisant l'intestin (Levy, 2007). Le microbiote intestinal est un acteur clé dans la maturation du système immunitaire puisqu'un défaut de colonisation peut avoir des conséquences sur le long terme et qu'un déséquilibre de cette microflore peut constituer une prédisposition au développement de pathologies à l'âge adulte (Stuivenberg *et al.*, 2022). Par ailleurs, le microbiote intestinal communique activement avec le système immunitaire.

**Tableau 1 : Agonistes des récepteurs TLR humains.**

<b>Famille</b>	<b>Agonistes microbiens</b>
<b>TLR1 et TLR2</b>	Triacyl lipopeptides (bactéries, mycobactéries)
<b>TLR2</b>	Lipoprotéines/lipopeptides, Peptidoglycane, acide lipoteichoïque, lipoarabinomannane
<b>TLR3</b>	ARN double brin (viral)
<b>TLR4</b>	Lipopolysaccharide, protéines virales
<b>TLR5</b>	Flagelline
<b>TLR6</b>	Diacyl lipopetides
<b>TLR7 et TLR8</b>	ARN simple brin (viral)
<b>TLR9</b>	ADN
<b>TLR10</b>	Inconnu

Cette communication passe notamment par la reconnaissance de motifs bactériens par les cellules de l'immunité innée (Zheng *et al.*, 2020) telles que les mastocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (aussi appelés granulocytes neutrophiles) (Guillot *et al.*, 2011). L'immunité innée représente la première ligne de défense contre l'invasion de pathogènes. Grâce à une multitude de récepteurs nommés « pattern recognition receptor » (PRR), ces cellules sont capables de reconnaître un grand nombre de motifs bactériens appelés « pathogen associated molecular patterns » (PAMP). Les principaux PRR impliqués dans cette reconnaissance appartiennent à la famille des Toll-like receptors (TLR) qui jouent un rôle dans l'activation de la réponse inflammatoire suite à la reconnaissance de divers composés microbiens (**Tableau 1**). D'autres récepteurs sont impliqués dans cette reconnaissance. C'est notamment le cas des récepteurs appartenant aux « Nucleotide oligomerization domain receptors » ou NLR (comprenant NOD, NALP et NAID) qui reconnaissent presque exclusivement des composants bactériens, ou des RLR qui reconnaissent des composants viraux (Takeda and Akira, 2007). Le microbiote intestinal intervient sur le système immunitaire en sécrétant des métabolites tels que les AGCC qui participent à la maturation du système immunitaire, contribuant à la prolifération et à la différenciation des cellules T comme les T régulateurs (Treg) ou les T helper (Th) mais aussi à la synthèse d'immunoglobulines A (IgA) et G (IgG) sécrétées par les cellules B du système immunitaire (Nguyen *et al.*, 2016).

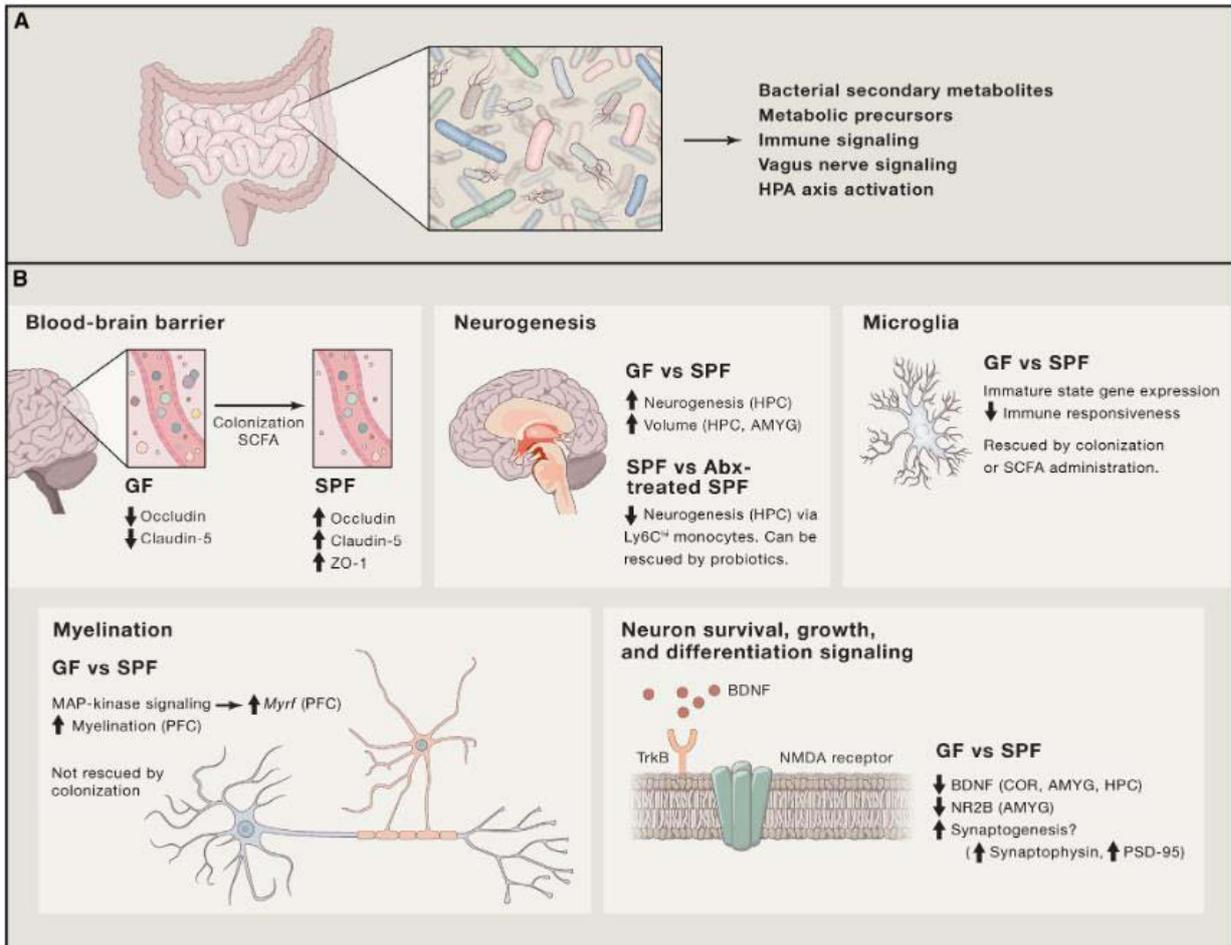
Une perturbation des interactions « microbiote-système immunitaire » a été rapportée dans certaines pathologies telles que les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), également caractérisées par une dysbiose du microbiote intestinal. Par exemple, chez ces patients, la mutation du gène NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2) a été corrélée au développement de la maladie de Crohn (Ogura *et al.*, 2001). Une perturbation de l'étape de colonisation pourrait contribuer au développement d'allergies à l'âge adulte notamment en altérant les étapes de développement et de maturation du système immunitaire. En effet, le risque de développer de l'asthme à l'âge adulte a été corrélé à une baisse de diversité microbienne chez l'enfant. La fenêtre de temps au cours de laquelle le microbiote intestinal jouerait un rôle crucial semble relativement restreinte. Cette période est d'autant plus importante que les atteintes du système immunitaire sont irréversibles. En effet, la colonisation par un microbiote à l'âge adulte ne permet pas de compenser ou de corriger ces atteintes. C'est notamment ce qui a été constaté chez la souris (Gensollen and Blumberg, 2017). Le microbiote intestinal pourrait aussi altérer la réponse immunitaire et les réactions allergiques alimentaires associées au développement de douleurs abdominales.



Dans une étude récente, la contribution du microbiote intestinal dans la modulation de la réponse immunitaire locale, dans un contexte de Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) suite à une infection intestinale, a été démontrée (Aguilera-Lizarraga *et al.*, 2021). La perturbation de la réponse immunitaire lors de l'infection perdure dans le temps et se traduit par une activation des mastocytes et par la sécrétion d'histamine lors de l'ingestion du composé alimentaire réactif mais aussi par le développement d'une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) chez la souris (Aguilera-Lizarraga *et al.*, 2021).

#### *1.3.4. Développement et maturation du système nerveux*

Au niveau intestinal, le microbiote semble jouer un rôle crucial en participant à la maturation du système nerveux entérique (SNE) et par conséquent sur la physiologie intestinale (Obata *et al.*, 2020). La déplétion de microbiote chez la souris conduit au développement d'un SNE immature chez l'adulte caractérisé par un défaut de la motilité intestinale (Collins *et al.*, 2014; De Vadder *et al.*, 2018), et par une densité nerveuse réduite (Collins *et al.*, 2014). De plus, la période post-natale semble jouer un rôle décisif puisqu'un défaut de colonisation au stade précoce conduit à des perturbations sur le long-terme (Heiss and Olofsson, 2019). Récemment, une étude a mis en évidence le rôle primordial du microbiote intestinal sur le SNE. Dans cette étude, la déplétion du microbiote par un traitement antibiotique induit une altération de la structure et de la fonction intestinale, notamment en allongeant le temps de transit, en modifiant les sécrétions intestinales et en augmentant la perméabilité intestinale chez la souris. Ces altérations s'accompagnent d'une perte de neurones entériques, à la fois dans les plexi myentériques et sous-muqueux (Obata *et al.*, 2020). La restauration du microbiote intestinal s'accompagne à l'inverse d'une multiplication neuronale et gliale au niveau entérique, ce qui est la preuve que le microbiote intestinal intervient dans la fonction mais aussi dans la structuration et dans le maintien du SNE. Bien que l'interaction bactérie-neurone ne soit pas encore totalement décrite, il semblerait que ce dialogue passe par des métabolites ou des motifs microbiens tels que les AGCC ou les lipopolysaccharides (LPS) (Vicentini *et al.*, 2021). De par sa proximité avec la paroi intestinale, le microbiote pourrait communiquer directement avec le SNE. La mise en évidence de l'expression de récepteurs tels que TLR2, TLR3, TLR4 et TLR7 par le SNE chez la souris et chez l'Homme suggère que ces interactions pourraient modifier les contractions musculaires au niveau du côlon (Barajon *et al.*, 2009).



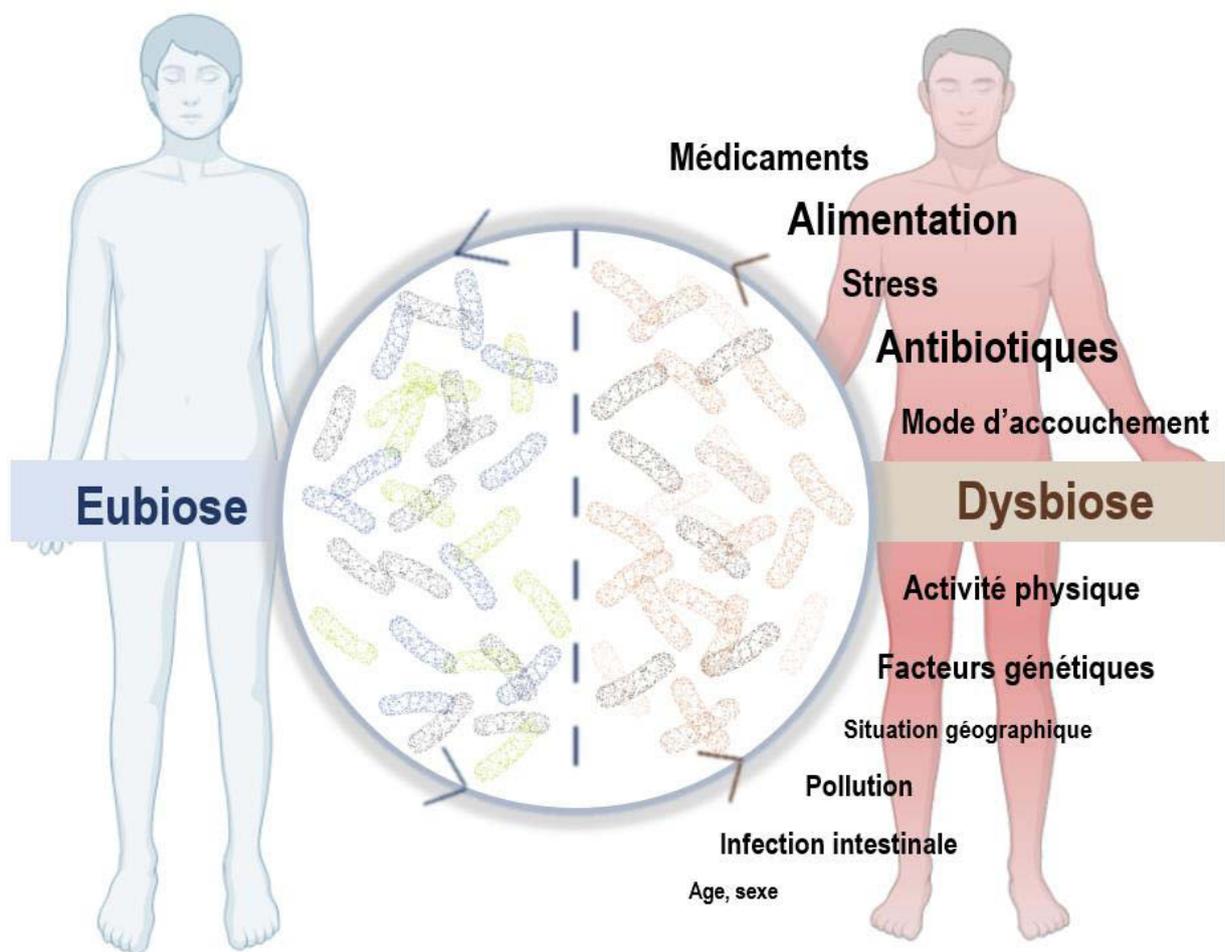
**Figure 4 : Intervention du microbiote intestinal sur le système nerveux.** (A) Le microbiote intestinal communique avec le cerveau par des voies directes et indirectes. (B) Les processus développementaux de base sont modulés à la suite de la colonisation des animaux axéniques ou de la déplétion de microbiote par des antibiotiques. Plus précisément, les processus suivants sont modulés : la formation et l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la neurogénèse, la maturation et la ramification microgliale, la myélinisation, l'expression de neurotrophines et de neurotransmetteurs et de leurs récepteurs respectifs (Sharon *et al.*, 2016).

Il est aujourd'hui admis que les neurones du système nerveux central (SNC) et que les structures cérébrales sont formées avant la naissance. Néanmoins, le SNC évolue au cours des 20 premières années de notre existence. La contribution du microbiote intestinal dans le développement, la maturation et le fonctionnement du SNC est aujourd'hui fortement suggérée (Heiss and Olofsson, 2019). En participant à la formation et au maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), à la neurogénèse, à la maturation et à la ramification des cellules gliales, au processus de myélinisation et en modulant la synthèse de neurotransmetteurs, le microbiote intervient activement sur le SNC (Sharon *et al.*, 2014) (**Figure 4**).

#### 1.4. Eubiose, dysbiose et résilience du microbiote intestinal

Le terme d'**eubiose**, encore peu employé, définit l'état d'équilibre du microbiote intestinal. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de définition précise de ce terme. Toutefois, l'eubiose désigne un microbiote équilibré, observé chez des sujets sains (Brüssow, 2020). Ce microbiote est notamment composé d'un « core microbiote », c'est-à-dire, d'un ensemble de microorganismes retrouvés systématiquement chez des individus sains. Même s'il n'est pas aisé de définir ce qu'est un microbiote équilibré du fait de la variabilité inter et intra-individuelle, les progrès en matière de séquençage ont permis d'identifier une cinquantaine d'espèces bactériennes communes à tous les individus sains et constituant le « **core microbiote intestinal** » (Huse *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2010b).

À l'inverse, le terme de **dysbiose** intestinale se définit comme une perturbation de la flore intestinale. De manière générale, elle se traduit par un déséquilibre entre les souches bénéfiques et les souches délétères. Une meilleure caractérisation de la dysbiose intestinale a permis de proposer plusieurs définitions. Vangay *et al.*, (2015) proposent de distinguer 4 formes de dysbiose caractérisées par : (i) une disparition de certains taxa essentiels, (ii) une perte de diversité microbienne, (iii) un changement dans le métabolisme, ou encore, (iv) la prolifération de microorganismes pathogènes. Le microbiote intestinal, bien qu'il soit relativement connu aujourd'hui, n'est pas figé dans le temps et sa versatilité représente une difficulté dans la compréhension de son rôle dans la santé de l'hôte. En effet, le microbiote intestinal peut varier d'un individu à un autre mais aussi au sein d'un même individu au cours du temps.



**Figure 5 : Facteurs intrinsèques et extrinsèques à l'origine d'une perturbation du microbiote intestinal.**

Divers facteurs, qu'ils soient intrinsèques comme les facteurs génétiques, l'âge ou le sexe par exemple, ou bien extrinsèques comme les traitements antibiotiques, l'alimentation, le mode d'accouchement, l'activité physique, la pollution ou le stress, participent à l'évolution de la composition du microbiote intestinal (**Figure 5**). Lorsque l'évènement perturbateur est minime ou isolé, le microbiote est capable de revenir à un état d'équilibre, identique ou proche de son état initial. Le microbiote est alors qualifié de **résilient**. En revanche, l'accumulation de plusieurs évènements stressants associés à des facteurs génétiques prédisposants peut favoriser le développement de pathologies. En effet, un épisode de dysbiose intestinale durable peut promouvoir la prolifération d'espèces bactériennes pro-inflammatoires au détriment de bactéries anti-inflammatoires, mais peut aussi conduire à la croissance de pathogènes opportunistes. Ce déséquilibre pourrait ainsi être à l'origine d'une inflammation de la muqueuse intestinale et d'une augmentation de la perméabilité intestinale (Drago *et al.*, 2019). Ainsi, un microbiote intestinal dans un état dit « **dysbiotique** » est souvent incriminé dans le développement de diverses pathologies, qu'elles soient extra-intestinales comme les maladies cardiovasculaires ou neuropsychiatriques, le diabète ou l'obésité, ou bien intestinales comme le cancer colorectal, les MICI ou le SII dans lesquelles la dysbiose est caractérisée par un ratio Firmicutes/Bacteroidetes perturbé (Jeffery *et al.*, 2012; Rajilic *et al.*, 2011; tana *et al.*, 2009; Tap *et al.*, 2017).

## 2. Dysbiose du microbiote intestinal associée à des douleurs chroniques

### 2.1. Physiologie de la douleur

#### 2.1.1. Définitions et composantes de la douleur

L'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) a proposé la définition suivante : « la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite dans des termes impliquant une telle lésion » (Cohen *et al.*, 2018). La douleur est qualifiée d'aigüe lorsqu'elle s'étend sur une courte durée ou de douleur chronique si celle-ci est récurrente ou persiste au-delà de 3 mois (Treede *et al.*, 2015). Elle fait souvent suite à un dysfonctionnement du SNC ou périphérique ou lorsque l'atteinte tissulaire est prolongée. Plusieurs types de douleurs chroniques existent et peuvent être classées selon leurs mécanismes. Cohen *et al.*, (2021) a défini 3 types de douleur que sont la douleur neuropathique, la douleur nociceptive ou encore la douleur nociplastique :



- **La douleur neuropathique** résulte de blessures ou d'altérations chroniques des voies nerveuses périphériques et centrales. Les lésions associées concernent directement le système de détection de la douleur qui devient défaillant et incontrôlable par des antalgiques classiques.
- **La douleur par excès de nociception** ou **douleur nociceptive**, résulte d'une réponse normale de l'organisme à un stimulus nociceptif et a pour objectif de protéger l'organisme d'un danger.
- **La douleur dysfonctionnelle** aussi appelée **douleur nociplastique** est quant à elle rencontrée dans des pathologies bien précises dans lesquelles le patient souffre d'un dysfonctionnement des systèmes de contrôle sans lésion associée. C'est notamment le cas des patients migraineux, fibromyalgiques ou des patients atteints du SII.

À ces douleurs s'ajoutent aussi **la douleur inflammatoire**, associée à une réaction inflammatoire anormale et persistante et **les douleurs mixtes** associant une composante neuropathique et une composante inflammatoire. Ces douleurs peuvent être d'origine viscérale ou somatique selon les organes concernés et la sensation engendrée. L'activation des récepteurs impliqués dans la transmission douloureuse viscérale au sein des organes internes entraîne une sensation profonde et mal localisée tandis qu'en cas de douleur somatique affectant les autres organes (peau, muscles, squelette, articulations et tissus conjonctifs), celle-ci est plus focale.

La douleur est subjective, ressentie différemment d'une personne à une autre. En effet, les facteurs psychologiques modulent l'intensité de la douleur ressentie et peuvent modifier différents aspects comportementaux liés à la mémoire ou à l'attention. La chronicité de la douleur peut également être à l'origine d'une détresse psychologique ou du développement de troubles cognitivo-émotionnels tels que l'anxiété ou la dépression. Finalement, la douleur fait intervenir 4 composantes fondamentales : (1) la composante sensori-discriminative, qui permet d'en identifier l'origine et d'apprécier son intensité, (2) les composantes affectives et émotionnelles, qui permettent d'associer un sentiment, une émotion ou bien une réaction en réponse à la douleur ressentie, (3) la composante cognitive et enfin (4) la composante comportementale faisant référence aux expériences déjà vécues dans le passé.

Dans cette **Revue bibliographique**, nous nous intéresserons plus précisément à la **douleur nociceptive** et à sa modulation *via* une interaction directe ou indirecte avec des microorganismes.

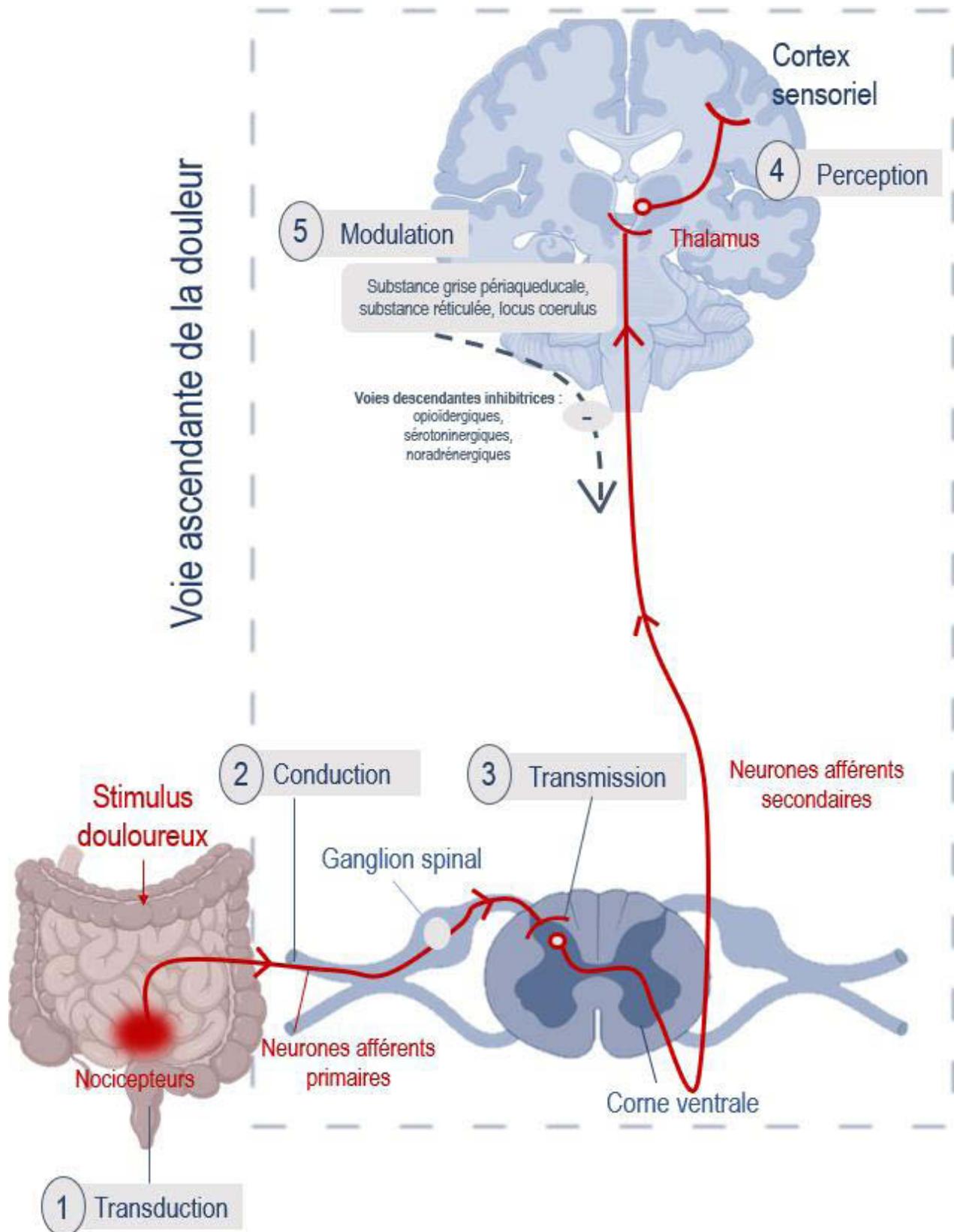


Figure 6 : Représentation schématique de la voie ascendante de la douleur.

### 2.1.2. *Le processus douloureux*

La douleur constitue un signal d'alarme visant à protéger l'organisme en déclenchant des réactions autonomes ou comportementales permettant d'en diminuer la cause. Les systèmes biologiques impliqués dans le codage, la transmission et l'intégration d'un stimulus nocif sont à l'origine de la nociception (Le Bars and Willer, 2004). Le message nociceptif ou douloureux fait suite à une stimulation douloureuse de nature mécanique, chimique ou thermique, qui s'établit au niveau de terminaisons nerveuses situées dans les tissus cutanés, musculaires, articulaires et viscéraux.

Le processus douloureux suit un cheminement complexe, impliquant des événements électrochimiques, en plusieurs étapes (**Figure 6**) :

- **La transduction** : Le codage d'un stimulus nocif est assuré par un panel de récepteurs et de canaux à la terminaison des fibres afférentes primaires leur conférant soit leur spécificité à un type de stimulation soit leur polymodalité. L'activation de ces transducteurs engendre la dépolarisation de la membrane neuronale qui, si elle est suffisante, déclenchera un potentiel d'action qui constitue l'unité de transmission du signal sensitif.
- **La conduction** : La durée et l'intensité de stimulation sont codées en fréquence de potentiels d'action se propageant le long de l'axone des fibres afférentes, aussi appelés nocicepteurs. Le message douloureux est véhiculé majoritairement par les fibres de petit calibre de type C non myélinisées et par les fibres de type A $\delta$  faiblement myélinisées, rassemblées en nerfs, vers le SNC. Ces cellules ont leurs corps cellulaires dans les ganglions rachidiens.
- **La transmission** : Cette étape neurochimique permet la transformation du message électrique en message chimique permettant la transmission du signal d'une cellule à une autre par la synapse. Elle intervient à tous les niveaux du SNC et permet de distribuer l'information aux structures concernées. Le premier relais s'effectue au sein de la corne dorsale de la moelle épinière et cette étape de transmission est le siège d'une importante modulation par des réseaux d'interneurones excitateurs ou inhibiteurs facilitant ou inhibant l'information nociceptive (Le Bars and Willer, 2004). Les neurones spinaux de second ordre contactés par les fibres afférentes primaires donnent naissance à des faisceaux ascendants atteignant différentes cibles du SNC (thalamus, hypothalamus, structures du tronc cérébral) impliquées dans la perception ou la modulation de l'information douloureuse.



**Figure 7 : Prévalence du Syndrome de l'Intestin Irritable à travers le monde selon les critères de Rome IV (Oka *et al.*, 2020).**

- **La modulation** : Plusieurs structures du tronc cérébral (substance grise périaqueducale, substance réticulée, locus coeruleus) régulent la transmission spinale *via* des voies descendantes inhibitrices opioïdiques, sérotoninergiques ou noradrénergiques. Ainsi, de nombreux messages nocifs n'atteignent jamais un niveau de perception consciente.
- **La perception** : Les neurones de second ordre projettent vers les structures supra-spinales sur des neurones tertiaires notamment au niveau du thalamus, véritable centre de tri des informations sensorielles (Uhlig *et al.*, 2020). Les neurones tertiaires conduisent les informations nociceptives vers différentes régions corticales : cortex somatosensoriel (S1 & S2), cortex cingulaire antérieur, cortex insulaire et certaines structures limbiques (hypothalamus, amygdale, hippocampe...) permettant ainsi de caractériser l'information douloureuse selon son aspect sensori-discriminatif d'une part et d'y associer sa composante émotionnelle. Cette perception, en conditions physiologiques permet, en retour, d'adapter la réponse de l'organisme par des réactions comportementales ou autonomes.

## 2.2. Dysbiose du microbiote intestinal associée à des douleurs abdominales chroniques

Le microbiote intestinal participe à la physiopathologie de maladies intestinales. En effet, une dysbiose du microbiote a été décrite dans le cas de colites infantiles (Dubois and Gregory, 2016), de diverticulose du côlon (Daniels *et al.*, 2014), du syndrome de douleur pelvienne chronique (Arora *et al.*, 2017) ou de cystite (Yıldırım *et al.*, 2020), mais aussi dans le cas du SII ou des MICI et pourrait largement contribuer au développement de douleurs abdominales chroniques. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux douleurs abdominales associées à une dysbiose du microbiote intestinal dans le SII et les MICI.

### 2.2.1. Le syndrome de l'intestin irritable

#### 2.2.1.1. Physiopathologie du syndrome de l'intestin irritable

Les maladies fonctionnelles digestives représentent 40% des motifs de consultation en gastroentérologie (Drossman, 2016). Le SII est une colopathie fonctionnelle chronique touchant entre 3% et 5% de la population mondiale (Oka *et al.*, 2020) (**Figure 7**) et se caractérisant par des douleurs abdominales, des ballonnements et des troubles du transit (Paré *et al.*, 2006).

## Echelle de Bristol

Constipation	<b>Type 1</b>		Selles dures, en billes, «crottes de bique»
	<b>Type 2</b>		Selles dures, en forme de saucisse, mais bosselées
IDÉAL	<b>Type 3</b>		Selles, dures, en forme de saucisse, mais la surface est craquelée
	<b>Type 4</b>		Selles molles moulées, en forme de saucisse/serpentin, surface lisse
Diarrhée	<b>Type 5</b>		Selles morcelées, petits morceaux mous mais à bords nets
	<b>Type 6</b>		Selles déchirées et détrempées, amas
	<b>Type 7</b>		Selles liquides. Présence éventuelle de glaires grasses ou d'aliments non digérés

Figure 8 : Échelle de Bristol.

Bien qu'elle n'engage pas le pronostic vital, cette pathologie est très invalidante et altère de façon significative la qualité de vie des patients (Paré *et al.*, 2006). Ce syndrome touche essentiellement les femmes, avec un ratio de 2 femmes pour 1 homme, et conduit au développement de troubles moteurs et d'une hypersensibilité viscérale. De plus, les patients atteints de SII peuvent présenter des comorbidités comportementales, psychologiques, rhumatologiques, neurologiques et pulmonaires (Shiha and Aziz, 2021). Son origine est multifactorielle et sa physiopathologie est encore peu connue. De nombreux facteurs pourraient être à l'origine de cette colopathie fonctionnelle tels que les facteurs génétiques, l'alimentation ou encore des infections intestinales à répétition ce qui complexifie sa compréhension (Hanevik *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2005).

La classification de Rome, qui a évolué en 2016 puisqu'elle a subi une mise à jour pour la 4<sup>ème</sup> fois depuis sa création en 1994 (Rome IV) (Marx *et al.*, 2018), fournit les recommandations diagnostiques des maladies fonctionnelles digestives et évolue au fil des années avec l'avancée des connaissances. Selon ces recommandations, un patient pourrait être atteint du SII s'il connaît une douleur abdominale récurrente au moins une fois par semaine en moyenne sur les 3 derniers mois, cette douleur étant associée à au moins deux des critères suivants : difficulté à la défécation et changement dans la fréquence et dans l'apparence des selles. Quatre formes de SII ont été décrites : (i) le SII avec diarrhée dominante (SII-D), (ii) le SII avec constipation dominante (SII-C), (iii) le SII mixte alternant des épisodes diarrhéiques et constipatoires (SII-M) et enfin (iv) le SII dit « inclassable » (SII-U). Ces différentes formes de SII se distinguent par l'apparence des selles, caractérisée grâce à l'échelle de Bristol (**Figure 8**). C'est une échelle visuelle permettant de classer les selles humaines en 7 catégories selon leur aspect. Elle est une véritable aide au diagnostic puisqu'elle permet d'évaluer le caractère diarrhéique ou constipatoire d'un SII. Au-delà des atteintes intestinales, certains patients développent des comorbidités associées au SII. Ces atteintes extra intestinales se caractérisent, la plupart du temps, par le développement d'un trouble anxieux voire d'une dépression et peut s'accompagner de céphalées, de bouffées de chaleurs, de douleurs musculaires ou encore d'une fatigue chronique (Midenfjord *et al.*, 2019). Ce tableau symptomatique très complexe affecte de façon significative la qualité de vie des patients atteints de SII.

#### 2.2.1.2. Syndrome de l'intestin irritable et dysbiose du microbiote intestinal

Bien que l'origine de ce syndrome ne soit pas encore clairement identifiée, l'implication du microbiote dans la physiopathologie du SII est largement décrite aujourd'hui.



En effet, l'analyse du microbiote chez les patients souffrant de SII a permis de mettre en évidence une dysbiose intestinale en lien avec les symptômes de la maladie. Ce déséquilibre au sein du microbiote intestinal se traduit par une diminution de la diversité microbienne. Le ratio Firmicutes/Bacteroidetes est notamment un indicateur de la perturbation de l'équilibre microbien chez ces patients. Plusieurs études ont mis en évidence une hausse de ce ratio chez des patients atteints de SII (Jeffery *et al.*, 2012; Rajilic *et al.*, 2011; Tana *et al.*, 2009; Tap *et al.*, 2017). Néanmoins, les résultats sont parfois contradictoires puisqu'une diminution du ratio Firmicutes/Bacteroidetes a été retrouvée dans une autre étude (Chong, 2019). Ces divergences peuvent notamment s'expliquer par des variations dans les méthodes de diagnostic ou de prélèvement utilisées. Cette dysbiose intestinale est aussi caractérisée par une hausse de l'abondance relative des *Lactobacillus*, des *Veillonella* (Tana *et al.*, 2009) et de *Ruminococcus* (Chong, 2019), mais aussi par une hausse des *Bacteroides* (Jeffery *et al.*, 2012; Parkes *et al.*, 2012) et des bactéries sulfato-réductrices (Crouzet *et al.*, 2013) tandis qu'une baisse de l'abondance des *Ruminococaceae*, des *Bifidobacterium*, de *Faecalibacterium* et des *Erysipelotrichaeae* a été rapportée. Cependant, les données concernant certaines espèces bactériennes sont parfois surprenantes. C'est notamment le cas de *Akkermansia muciniphila*, une souche associée à la muqueuse intestinale retrouvée augmentée (Gobert *et al.*, 2016) chez les patients atteints de SII alors que sa population diminue chez les patients atteints de MICI (Png *et al.*, 2010; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2013).

Au-delà de la composition du microbiote intestinal, les chercheurs s'intéressent aussi au caractère fonctionnel du microbiote et tentent d'identifier des signatures métaboliques caractéristiques de la pathologie et des différents sous-types du SII. Ainsi, l'identification de biomarqueurs constituerait une aide au diagnostic, permettrait de mieux comprendre la physiopathologie mais aussi d'envisager de nouvelles solutions thérapeutiques pour son traitement. De nombreuses études ont été menées mais les résultats ne sont pas toujours reproductibles. Ceci peut notamment être attribué à la multitude de techniques utilisées. Ainsi, bien qu'il y ait des divergences entre les profils des individus sains et ceux des individus atteints de SII, il n'est pas possible, à l'heure actuelle, d'identifier un biomarqueur de la pathologie. En revanche, la comparaison du microbiote et du profil métabolique ont permis de faire la distinction entre les différents sous-types de la maladie, à savoir, SII-D, SII-C, SII-M et SII-U. Néanmoins, il n'a pas été possible de déterminer un profil métabolique propre à chacun. L'étude du profil métabolique est une piste prometteuse mais nécessite une standardisation et une validation des protocoles (Bennet *et al.*, 2020).



### 2.2.1.3. Traitements du syndrome de l'intestin irritable

Les traitements du SII visent davantage à soulager le patient plutôt qu'à soigner la pathologie. En effet, l'étiologie de ce syndrome étant extrêmement complexe et encore mal comprise, il n'existe pas, à l'heure actuelle de traitements efficaces. Les patients atteints du SII présentent majoritairement des symptômes intestinaux se traduisant par des troubles du transit (constipation et/ou diarrhées), des ballonnements et des douleurs abdominales.

Un régime pauvre en aliments fermentescibles riches en oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides et polyols (**FODMAPs**) est très souvent recommandé afin de limiter ces symptômes intestinaux (Dionne *et al.*, 2018). Ce régime consiste à introduire un minimum de glucides fermentescibles dont la digestion conduit à la production de gaz, à l'origine des ballonnements et pouvant contribuer au développement de douleurs abdominales. Afin de réguler le transit intestinal, le médecin peut également prescrire des laxatifs ou bien au contraire, des ralentisseurs du transit intestinal. De plus, l'utilisation d'antispasmodiques peut être prescrite de façon ponctuelle. En neutralisant et en calmant les contractions musculaires intestinales, ces composés permettent de soulager le patient. Cependant, leur efficacité varie d'un patient à un autre et se révèlent souvent inefficaces. Enfin, la prescription d'antidépresseurs dans les cas les plus sévères n'est pas rare puisque, ces médicaments, au-delà d'avoir des effets sur l'anxiété ou la dépression, ont aussi des effets sur la douleur viscérale. Ces traitements de seconde intention pourraient influencer la motricité intestinale et soulager les patients en limitant les douleurs abdominales (Morgan *et al.*, 2005; Poitras *et al.*, 2002; Simrén and Tack, 2018) tout en réduisant la dépression. Ceci est aussi vrai pour les psychothérapies qui semblent aider le patient à mieux gérer la douleur au cours d'exercices de respiration, de méditation ou d'hypnothérapies (Ahl *et al.*, 2013; Laird *et al.*, 2017).

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

### 2.2.2.1. Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales

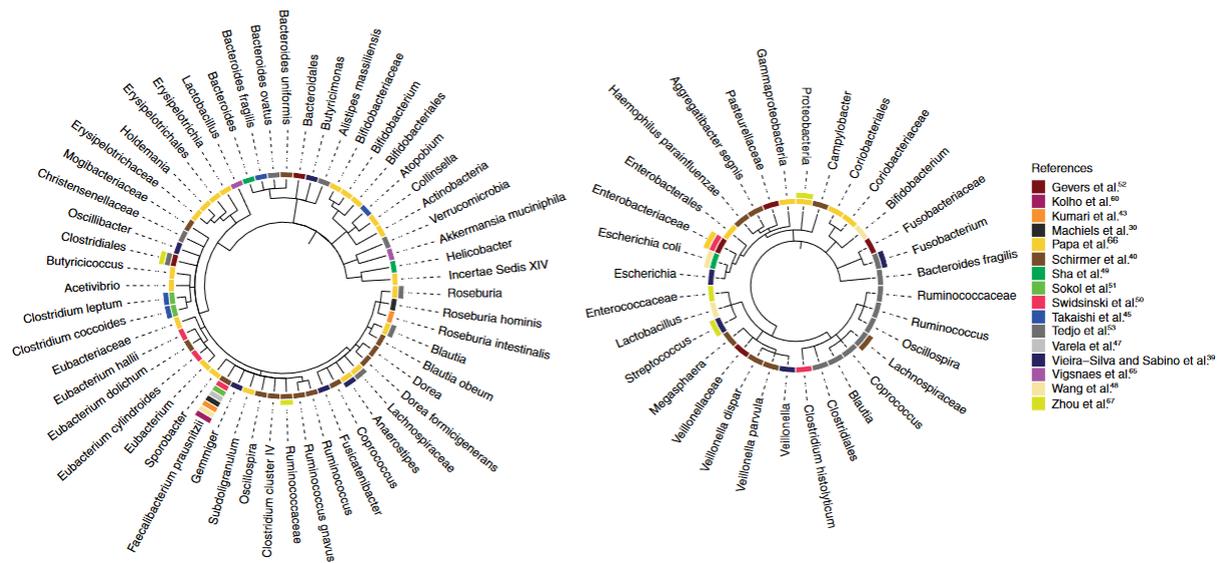
La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) font partie des MICI et se caractérisent par une inflammation partielle de la paroi du tube digestif. Cette inflammation se traduit, chez le patient, par des douleurs abdominales et des diarrhées.



Alors que 80% des patients atteints de MICI souffrent de douleurs abdominales en phase de crise (Szigethy, 2018), celles-ci persistent en phase de rémission chez 20% à 50% d'entre eux (Norton *et al.*, 2017; Regueiro *et al.*, 2017). Ces pathologies évoluent par poussées inflammatoires dont la fréquence et l'intensité sont aléatoires et imprévisibles. La MC peut entraîner la formation d'ulcères, des perforations de la paroi digestive ou des fissures sur l'ensemble du tube digestif, de l'œsophage au rectum contrairement à la RCH qui elle, surviendra uniquement sur l'extrémité distale du tube digestif, autrement dit, le côlon. Les patients peuvent également présenter de la fièvre et développer une appréhension à s'alimenter pouvant aller jusqu'au développement d'une anorexie mentale.

Les poussées inflammatoires sont des épisodes douloureux pouvant durer quelques semaines et sont espacées de périodes de rémission de durées très variables pouvant évoluer de quelques jours à quelques années, sans qu'il ne soit possible de prédire le prochain épisode inflammatoire. Tout comme le SII, l'origine des MICI est multifactorielle. Une réaction immunitaire anormale au niveau intestinal, se caractérisant notamment par la stimulation de cellules pro-inflammatoires telles que les Th1 et Th17 (Roda *et al.*, 2020) et par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ou les interleukines (IL) IL-1, IL-6, IL-12 et IL-18 a été décrite chez ces patients (Uhlir and Powrie, 2018). La réaction inflammatoire est alors inappropriée et exacerbée, dirigée contre des microorganismes non pathogènes. Bien que la dérégulation du système immunitaire intestinal ait été identifiée chez ces patients, d'autres facteurs augmentent les risques de développer la maladie, comme les facteurs génétiques, le tabac... (Roda *et al.*, 2020).

Au-delà du tractus digestif, les patients atteints de MICI peuvent développer des pathologies extra-intestinales comme des maladies musculo-articulaires (ex : arthrites périphériques), des maladies cutanées (ex : psoriasis), des maladies oculaires (ex : uvéite, conjonctivite), des maladies hépatobiliaires, des maladies vasculaires et sanguines, des maladies rénales, des maladies cardiaques ou encore des maladies neurologiques (Marotto *et al.*, 2020). Tout comme le SII, le tableau symptomatique de ces pathologies altère considérablement la qualité de vie des patients, plus particulièrement pendant les phases actives de la maladie (Knowles *et al.*, 2018b, 2018a).



**Figure 9 : Cladogramme représentant les signatures microbiennes retrouvées augmentées ou diminuées dans les phases actives ou inactives de la maladie.** À gauche, les bactéries dont l'abondance relative a été retrouvée augmentée dans la phase inactive et diminuée dans la phase active de la maladie. À droite, les bactéries dont l'abondance relative a été retrouvée augmentée dans la phase active de la maladie ou diminuée dans la phase inactive de la maladie. Ces cladogrammes ont été générés en compilant les données métagénomiques de plusieurs études et permettent d'identifier de potentielles bactéries bénéfiques (à gauche) ou au contraire délétères (à droite) pendant les phases actives de MICI (Caenepeel *et al.*, 2020).

#### 2.2.2.2. Maladies inflammatoires chroniques intestinales et dysbiose du microbiote intestinal

Une analyse de la composition du microbiote de patients atteints de MICI et de patients sains a permis de révéler une dysbiose au sein du microbiote intestinal et des signatures microbiennes spécifiques en lien avec la symptomatologie des patients (Frank *et al.*, 2007). Cette dysbiose intestinale se caractérise par une baisse de la diversité bactérienne avec une diminution de l'abondance relative des Firmicutes (Frank *et al.*, 2007; Gophna *et al.*, 2006) et une augmentation des Bacteroidetes et des *Enterobacteriaceae* (Hansen *et al.*, 2010). De plus, l'augmentation de l'abondance des bactéries entéro-pathogènes chez les patients atteints de MICI a été rapportée. C'est notamment le cas des *Escherichia coli* adhérents invasifs (AIEC) (Darfeuille *et al.*, 2004; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998).

Les premières études métagénomiques ont permis d'identifier des signatures microbiennes propres à chaque pathologie suggérant l'implication du microbiote intestinal dans le développement de la maladie ou bien, au contraire, dans le maintien de la santé de l'hôte. Ces signatures microbiennes sont essentiellement représentatives du microbiote luminal. Cependant, il est admis que le microbiote associé à la muqueuse intestinale est indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale. L'empreinte microbienne semble être différente à proximité de la muqueuse intestinale et son étude permettra d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques (Presti *et al.*, 2019).

Comme pour le SII, les chercheurs s'intéressent aujourd'hui au profil métabolique des patients atteints de MICI. Dans ce contexte, Weng *et al.*, (2019) ont identifié plusieurs métabolites tels que des acides gras à plus ou moins longue chaîne (acide arachidonique, acide oléique, acide isocaproïque) ou des acides biliaires moins abondants chez les patients atteints de MICI. Dans cette étude, ces profils métaboliques ont été corrélés à la composition du microbiote ainsi qu'aux préférences nutritionnelles des patients ce qui a permis d'identifier les micronutriments, les microorganismes et certains métabolites participant au développement ou au maintien de la pathologie. Une étude métagénomique a permis de montrer que les patients atteints de MC présentaient une abondance plus faible de bactéries productrices de butyrate. C'est notamment le cas des espèces *Blautia faecis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus torques*, *Clostridium lavalense*, *Bacteroides uniformis* et *Faecalibacterium prausnitzii* (Takahashi *et al.*, 2016). Les signatures microbiennes ont permis d'identifier quelques espèces bactériennes en vue de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Caenepeel *et al.*, 2020) (**Figure 9**).



### 2.2.2.3. Traitements des maladies inflammatoires chroniques intestinales

À l'heure actuelle, les traitements se limitent à soulager le patient dans les phases actives de la maladie. Ces pathologies étant caractérisées par une réaction inflammatoire exacerbée, les traitements actuellement utilisés ont pour principal objectif de limiter l'inflammation. Les traitements médicaux se composent d'anti-inflammatoires (5-aminosalicylates ou 5-ASA), de corticostéroïdes, d'immunosuppresseurs, d'antibiotiques, et autres (thiopurines, methotrexate, inhibiteurs de calcineurine) mais ceux-ci sont souvent mal tolérés par les patients et sont responsables d'effets indésirables. Le traitement immunosuppresseur consiste en une thérapie anti-TNF $\alpha$ . Ce traitement s'est révélé relativement efficace aussi bien sur les manifestations intestinales et extra-intestinales de la pathologie. Néanmoins, environ 25% des patients ne répondent pas au traitement sans que l'on connaisse la raison de cet échec (Caenepeel *et al.*, 2020). Un régime pauvre en fibres est recommandé en cas de poussées inflammatoires. Enfin, la chirurgie est envisagée uniquement dans le cas où les traitements médicamenteux se sont révélés inefficaces (Dray and Marteau, 2007) et consiste à retirer les fistules ou la/les zones enflammées des patients atteints de MC (Chandra and Moore, 2011; Fichera and Michelassi, 2007). Comme évoqué précédemment, les MICI sont caractérisées par des phases actives entrecoupées de périodes de rémission. Les phases de rémission se caractérisent par une inflammation à bas bruit et par des symptômes semblables à ceux du SII comme des douleurs abdominales chroniques pour lesquelles il n'existe pas de traitements efficaces. Dans ce contexte, plusieurs pistes sont actuellement explorées afin de limiter les douleurs abdominales chroniques dont souffrent les patients en rémission. C'est notamment le cas de la prégabaline ou de la gabapentine, capable de réduire l'HSVC chez la souris dans un modèle de colite induite chimiquement au Dextran Sulfate Sodium (DSS) (Meleine *et al.*, 2016).

### 2.3. Dysbiose du microbiote intestinal associée à des douleurs chroniques extra-intestinales

Le microbiote intestinal pourrait participer au processus douloureux à distance du TGI. Bien qu'il ne soit pas possible de savoir si un microbiote dysbiotique est à l'origine ou une conséquence de ces douleurs, l'étude du microbiote permet de révéler une perturbation de sa composition que ce soit dans le cas de la fibromyalgie, de neuropathies périphériques causées par la chimiothérapie (NPC) ou bien dans d'autres pathologies telles que la migraine (Tang *et al.*, 2020) ou encore des manifestations oculaires faisant intervenir l'axe de communication



« microbiote-intestin-céle » (Thomas and Lin, 2016). Cette liste non exhaustive révèle l'importance de considérer le microbiote intestinal comme partie intégrante de l'organisme et comme acteur potentiel dans la régulation de la douleur.

### 2.3.1. La migraine

La migraine est aujourd'hui un problème de santé publique majeur puisqu'elle touche environ 14% de la population mondiale (Stovner *et al.*, 2018) avec une prévalence plus forte chez les femmes que chez les hommes. Comme la plupart des maladies mentionnées dans ce manuscrit, la physiopathologie de la migraine est complexe et pourrait impliquer plusieurs facteurs tel que la perturbation de l'axe de communication établit entre le microbiote, l'intestin et le cerveau. Bien que les mécanismes ne soient pas totalement élucidés, l'inflammation et les propriétés neuro-immuno-modulatrices du microbiote intestinal pourraient contribuer au développement de la pathologie. En modulant l'inflammation, qui représente un élément capital dans la migraine, en modulant la production de neuropeptides ou en activant l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien (HHC), un microbiote dysbiotique pourrait contribuer au développement de la migraine (Arzani *et al.*, 2020). L'utilisation de modèles murins a permis de démontrer l'implication du microbiote intestinal dans le développement de migraine. Les propriétés immunomodulatrices intéressent plus particulièrement puisqu'en stimulant la production de TNF- $\alpha$ , un microbiote dysbiotique pourrait participer à la chronicisation de la migraine chez la souris (Tang *et al.*, 2020). De plus, que ce soit chez l'animal ou chez l'Homme, une dysbiose du microbiote intestinal a été observée chez les sujets migraineux (Chen *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2019). Cette dysbiose se caractérise, chez les femmes, par une baisse de diversité et par une hausse de *Clostridium spp.* À l'inverse, les espèces *F. prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis* et *Methanobrevibacter smithii* sont retrouvées plus abondantes chez les sujets sains (Chen *et al.*, 2020).

Les probiotiques constituent aujourd'hui une piste thérapeutique dans le traitement de la migraine notamment en rétablissant l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale. Le potentiel thérapeutique de certaines souches probiotiques a d'ores et déjà été exploré. C'est notamment le cas d'un cocktail de souches composé de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius* et *Lactococcus lactis*, qui, administré pendant 12 semaines à des patients migraineux a permis de réduire le nombre d'épisodes de migraine chez 67% des patients traités (de Roos *et al.*, 2015).



### 2.3.2. La fibromyalgie

La fibromyalgie se caractérise par une grande fatigue, des altérations cognitives et surtout par des douleurs musculosquelettiques généralisées. Elle reste aujourd'hui une énigme puisqu'aucune anomalie n'est détectée lors d'examen cliniques. L'analyse de la composition du microbiote n'a révélé aucune signature microbienne spécifique de la maladie. Néanmoins, une étude récente rapporte une abondance relative réduite des espèces *F. prausnitzii*, *B. uniformis*, *Prevotella copri* et *B. faecis* chez les patients atteints de fibromyalgie (Minerbi *et al.*, 2019). Les espèces bactériennes *F. prausnitzii* et *B. uniformis* sont des bactéries fortement productrices de butyrate. À l'inverse, l'abondance relative des espèces *Intestinimonas butyriciproducens*, *Flavonifractor plautii*, *Butyricoccus desmolans*, *Eisenbergiella tayi* et *Eisenbergiella massiliensis* également productrices de butyrate a été retrouvée augmentée chez ces patients (Minerbi *et al.*, 2019). À défaut d'identifier un marqueur microbien de cette pathologie, Clos-Garcia *et al.*, (2019) ont mis en évidence une altération du profil métabolique chez les patients atteints de fibromyalgie, donnant une dimension fonctionnelle au microbiote. Une altération du niveau de glutamate et de sérine a été rapportée suggérant que le microbiote jouerait un rôle important dans le métabolisme des neurotransmetteurs. Ainsi, bien que le rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie de la fibromyalgie soit encore peu compris, il semblerait qu'une altération de sa composition et de son métabolisme contribuent au développement de la fibromyalgie. Ces résultats préliminaires sont encourageants et permettent d'envisager la modulation du microbiote intestinal comme cible thérapeutique.

Le potentiel thérapeutique de souches probiotiques a d'ores et déjà été évalué. Dans une étude récente, l'administration d'un cocktail de probiotiques composé des souches *Lactobacillus rhamnosus* GG®, *L. casei*, *L. acidophilus* et *B. bifidum* a permis de réduire le comportement impulsif chez les patients fibromyalgiques (Roman *et al.*, 2018). Des études plus approfondies sont aujourd'hui nécessaires afin d'envisager les souches probiotiques comme traitement ou comme médecine complémentaire destinés aux patients atteints de fibromyalgie.

### 2.3.3. Les neuropathies périphériques causées par la chimiothérapie

Le développement de cancer est devenu une problématique sanitaire de premier ordre et la recherche de traitements thérapeutiques une priorité et fait l'objet de la stratégie décennale de lutte contre les cancers (2021-2030). Plusieurs traitements anti-cancéreux existent à l'heure actuelle mais certains sont responsables d'effets secondaires non négligeables, affectant la qualité de vie des patients. C'est notamment le cas de la chimiothérapie.



Certaines molécules comme l'oxaliplatine ou encore le paclitaxel entraînent des douleurs chroniques pouvant se prolonger après la fin du traitement. Le développement d'une hyperalgie périphérique 6 mois après le traitement par chimiothérapie touche environ 30% des patients (Seretny *et al.*, 2014) et est qualifiée de neuropathie périphérique causée par la chimiothérapie ou NPC. Certaines études récentes suggèrent que la chimiothérapie pourrait avoir un impact négatif sur le microbiote intestinal. En affectant sa composition mais aussi en augmentant la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale, le traitement par chimiothérapie peut être à l'origine d'une dysbiose (Huang *et al.*, 2012; Montassier *et al.*, 2015).

L'implication du microbiote intestinal dans le développement de cette hyperalgie périphérique à la suite d'un traitement par oxaliplatine a été étudiée chez la souris. La déplétion du microbiote intestinal chez des souris axéniques ou ayant reçu un traitement antibiotique permet d'augmenter le seuil de douleur mécanique. De plus, la recolonisation des souris axéniques conduit à la perte de cet effet protecteur (Shen *et al.*, 2017). Une étude plus récente évaluant la contribution du microbiote intestinal dans le développement et la persistance d'une NPC a récemment montré que la déplétion de microbiote chez des souris traitées à l'oxaliplatine permettait de réduire l'allodynie mécanique induite par le traitement. La contribution du microbiote intestinal dans le phénotype douloureux a été confirmée puisque la restauration d'un microbiote par transplantation de microbiote fécal (TMF) a permis de rétablir le phénotype douloureux dans ce même contexte (Ma *et al.*, 2022).

Néanmoins, bien que l'importance du microbiote intestinal ait été largement suggérée, les mécanismes d'interaction sont encore peu connus. Il semblerait que plusieurs voies soient engagées. D'une part, le microbiote intestinal peut moduler la réponse de l'hôte au traitement administré en métabolisant les molécules chimiothérapeutiques en métabolites secondaires toxiques. D'autre part, en augmentant la perméabilité intestinale, le traitement administré au patient pourrait favoriser la translocation bactérienne et conduire à une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Pouncey *et al.*, 2018).

Le microbiote intestinal est donc devenu une cible d'étude dans la recherche de solutions thérapeutiques visant à réduire la toxicité et à augmenter l'efficacité des drogues utilisées dans le traitement de cancer mais aussi à soulager les patients des effets secondaires handicapants tels que l'hyperalgie périphérique (Alexander *et al.*, 2017).



### 3. Troubles anxio-dépressifs associés à une dysbiose du microbiote intestinal

#### 3.1. Les troubles anxio-dépressifs

Le dernier manuel de diagnostic et statistique des troubles mentaux (DSM-V) définit les troubles anxieux comme un ensemble de troubles psychologiques dont les symptômes sont notamment une anxiété excessive, un sentiment de peur, des inquiétudes et des comportements d'évitement. Les personnes ayant un trouble anxieux manifestent des symptômes cognitifs, physiques et comportementaux d'angoisse plus ou moins intenses et fréquents pouvant nuire à leur qualité de vie à différents niveaux. À ce jour, le DSM-V reconnaît 7 troubles anxieux.

La dépression est quant à elle une pathologie se caractérisant par un sentiment de désespoir, par une perte de motivation et peut également se traduire par une perte d'appétit ainsi que par des troubles du sommeil. C'est l'un des troubles psychiatriques les plus répandus et la crise sanitaire de la COVID-19 a eu un impact important sur la prévalence de cette pathologie puisqu'elle est passée de 3.44% en 2017 à 25% en 2021 (Bueno-Notivol *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2021). Les traitements actuels sont majoritairement des antidépresseurs mais se révèlent inefficaces pour environ 30% des patients (Peng *et al.*, 2018).

#### 3.2. Implication du microbiote intestinal dans les troubles anxio-dépressifs

Les dernières recherches indiquent qu'une modification de la composition du microbiote intestinal pourrait affecter les aspects psychologiques et comportementaux dans certains contextes pathologiques. En effet, des troubles du comportement tels qu'une réaction exacerbée face au stress, un trouble anxieux et/ou dépressif peuvent être observés chez certains patients atteints de SII ou de MICI. Ces troubles anxio-dépressifs sont qualifiés de comorbidités associées à la pathologie. La prévalence de ces troubles comportementaux est sensiblement la même entre le SII et les MICI avec 32.1 à 39.1% pour le trouble anxieux et 25.2 à 28.8% pour le trouble dépressif (Barberio *et al.*, 2021; Zamani *et al.*, 2019) bien que leur sévérité soit plus marquée chez les patients atteints de SII (Geng *et al.*, 2018). L'influence du microbiote intestinal dans la physiopathologie de la dépression est une piste récemment explorée.

L'analyse du microbiote de patients souffrant de dépression met en évidence des différences dans la composition du microbiote. En effet, bien que certains résultats divergent, certaines espèces ou genres bactériens ont été retrouvés augmentés comme *Blautia*, *Anaerostipes*, *Clostridium* et *Klebsiella* ou, à l'inverse, diminués comme *Bifidobacterium*, *Dialister* ou



*Faecalibacterium* chez les patients atteints de dépression (Cheung *et al.*, 2019). Tout comme pour la dépression, le microbiote intestinal semble intervenir dans le développement du trouble anxieux. Par exemple, le microbiote intestinal de patients atteints du trouble anxieux généralisé est caractérisé par une baisse de la diversité et de la richesse bactérienne, et plus particulièrement de bactéries productrices d'AGCC et au contraire d'une prolifération de bactéries telles que *Escherichia-Shigella*, *Fusobacterium* et *Ruminococcus gnavus* (Jiang *et al.*, 2018). Chez l'animal, le lien entre le microbiote intestinal et l'anxiété a été largement exploré et semble impliquer des mécanismes moléculaires communs à ceux de la dépression tels que l'intervention de l'axe corticotrope (Luna and Foster, 2015), la production de neurotransmetteurs ou la perturbation du métabolisme du tryptophane (Huang and Wu, 2021).

La contribution du microbiote intestinal dans le développement de troubles anxio-dépressifs étant aujourd'hui fortement suggérée, la modulation de sa composition par diverses stratégies constitue une piste thérapeutique intéressante pour le traitement des troubles anxio-dépressifs. Alors que l'administration de prébiotiques n'a pas révélé d'effet significativement bénéfique, certaines souches probiotiques semblent avoir un effet intéressant, bien qu'il soit faible. Les résultats d'une méta-analyse ont notamment révélé le potentiel thérapeutique de cocktails de souches probiotiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Des études complémentaires sont aujourd'hui nécessaires afin de confirmer leur potentiel thérapeutique dans le traitement de la dépression (Liu *et al.*, 2019). La TMF est une autre stratégie de modulation du microbiote intestinal qui suscite un fort intérêt. Dans une étude, les chercheurs ont mis en évidence une baisse de la diversité et de la richesse microbienne chez 43 patients atteints de dépression. La transplantation de leur microbiote fécal a permis de transférer le phénotype dépressif chez des rats axéniques suggérant que le microbiote intestinal jouerait un rôle crucial dans la mise en place et dans le maintien du trouble dépressif (Kelly *et al.*, 2016). Enfin, la contribution d'un régime riche en graisses dans le développement de la dépression a été démontrée chez la souris. Cet effet a été caractérisé, au niveau intestinal, par une modification de la composition du microbiote fécal, avec une augmentation de l'abondance relative des Firmicutes et une diminution de l'abondance relative des Bacteroidetes (Hassan *et al.*, 2019). Toutes ces données renforcent l'idée que le microbiote intestinal module les aspects comportementaux ce qui en fait une cible thérapeutique pour leur traitement.



### 3.3. Implication de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans le développement de troubles anxio-dépressifs

#### 3.3.1. Voies de communication empruntées par le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal tient une place centrale dans la physiologie de l'hôte et pourrait participer au développement des troubles anxio-dépressifs chez les patients atteints de pathologies intestinales en empruntant l'axe de communication **microbiote-intestin-cerveau**. Cet axe de communication tripartite est bidirectionnel. Il est le siège d'un flux constant d'informations entre ces 3 partenaires. Les métabolites bactériens, qu'ils soient sécrétés dans la lumière intestinale ou bien constitutifs de leur paroi, interviennent dans cet axe en empruntant plusieurs voies :

**La voie sanguine**, par laquelle les produits issus du métabolisme bactérien libérés dans la lumière intestinale franchissent la barrière épithéliale intestinale, rejoignent la circulation générale et traversent la BHE.

**La voie immune** par laquelle les motifs bactériens sont capables de moduler le système immunitaire et l'inflammation. Dans cette voie, l'augmentation de la perméabilité intestinale favorise la stimulation des cellules immunitaires. L'état inflammatoire peut alors affecter le système nerveux.

**La voie nerveuse** : En interagissant de façon directe ou indirecte avec le SNE, le microbiote intestinal est capable de moduler le processus douloureux *via* la voie nerveuse. En effet, les neurones du système nerveux sont stimulés par les signaux bactériens et peuvent intégrer les messages viscéraux.

**La voie endocrine** : Le microbiote intestinal peut interagir de façon directe avec les cellules endocrines, les cellules entérochromaffines et le système immunitaire associé à la muqueuse intestinale. Cette interaction peut conduire à la libération de neuropeptides pouvant agir localement sur les afférences du SNE ou gagner le SNC par la circulation sanguine.

Un microbiote intestinal dysbiotique peut moduler ces voies de communication en agissant sur la neurotransmission, la réponse immunitaire et sur le fonctionnement de l'axe corticotrope.



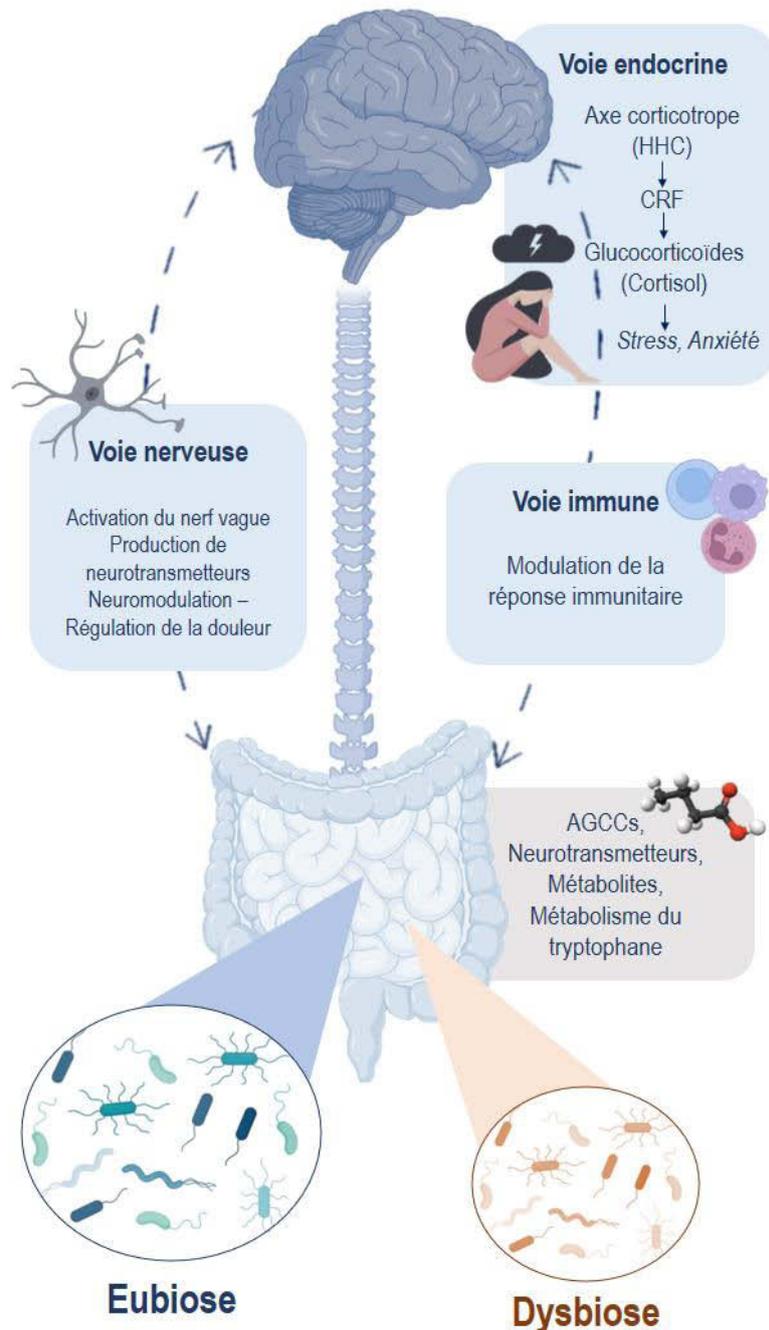
### 3.3.2. Implication des métabolites bactériens

En synthétisant ou en modulant la synthèse de neurotransmetteurs tels que la sérotonine (5-HT), l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), la dopamine, la noradrénaline, le facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF), l'histamine ou de métabolites bactériens tels que les AGCC, le microbiote peut participer au développement de troubles anxio-dépressifs.

La voie de dégradation du tryptophane a été identifiée dans le développement de troubles dépressifs. En effet, les catabolites du tryptophane tels que l'acide kynurénique (KYNA) et l'acide quinolinique (QUIN) pourraient contribuer au développement de symptômes dépressifs. Certaines bactéries appartenant à la classe des *Clostridia* sont notamment capables de produire l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) responsable de la production de ces métabolites (Morris *et al.*, 2017).

La 5-HT est produite à 90% au niveau intestinal. Au niveau central, elle joue un rôle important dans le contrôle de l'humeur et des émotions mais aussi au niveau intestinal, en régulant le péristaltisme. Le microbiote intestinal est capable de moduler la production de 5-HT *via* la synthèse de butyrate, un AGCC, reconnu pour stimuler la production de 5-HT par les cellules entérochromaffines (Lund *et al.*, 2018). Certaines bactéries commensales intestinales auraient aussi les enzymes nécessaires à la synthèse de sérotonine et pourraient ainsi contribuer à moduler sa concentration. C'est notamment le cas des genres *Akkermansia*, *Alistipes* et *Roseburia* (Valles-Colomer *et al.*, 2019).

La teneur en GABA, neurotransmetteur inhibiteur principal du SNC, a été inversement corrélée au développement de dépression. En effet, le niveau de GABA sérique est retrouvé diminué chez les patients atteints de trouble dépressif (Petty *et al.*, 1992). Les récepteurs au GABA, et plus particulièrement le récepteur GABA<sub>B</sub>, est rapidement devenu une cible thérapeutique dans son traitement (Felice *et al.*, 2016; Möhler, 2012). Un grand nombre de bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont reconnues pour leur capacité à produire du GABA. C'est notamment le cas de *B. adolescentis* (Duranti, 2020) ou de *Bifidobacterium dentium* (Pokusaeva *et al.*, 2017a). Cette propriété est largement retrouvée au sein du microbiote intestinal puisque des bactéries appartenant aux genres *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipes*, *Odoribacter* et *Prevotella* sont aussi capables d'en produire (Yunes *et al.*, 2016).



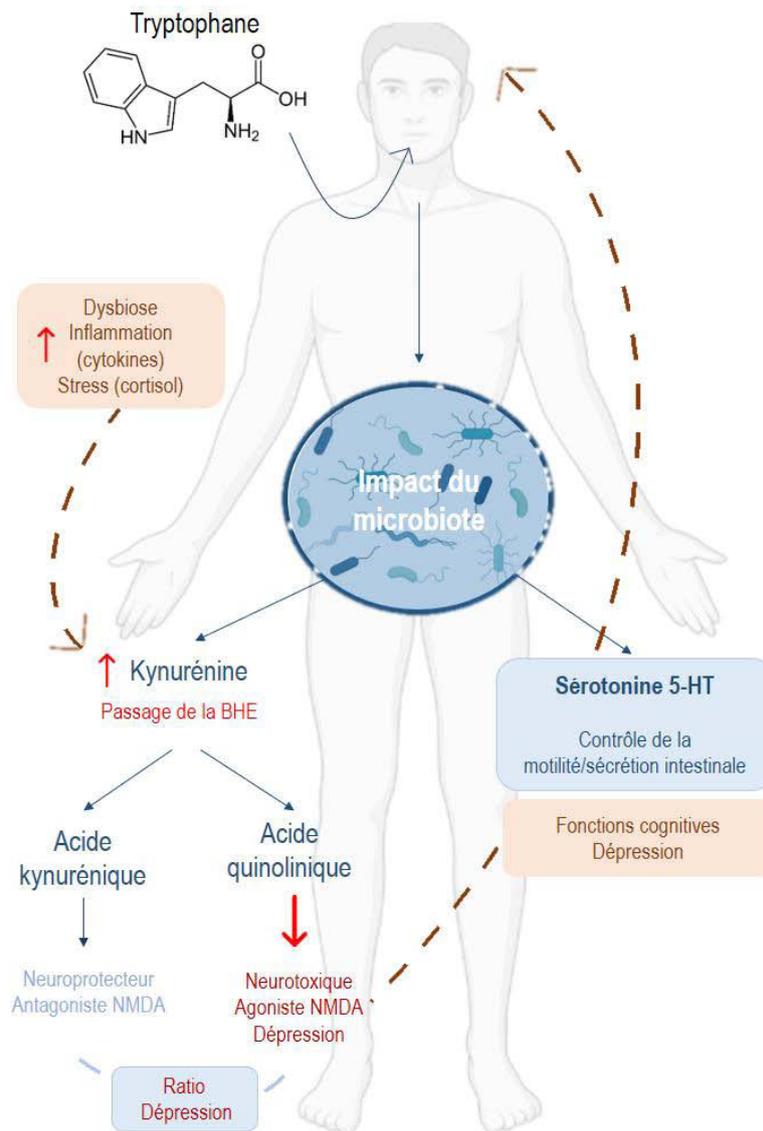
**Figure 10 : Grandes voies de modulation de l'axe intestin-cerveau par le microbiote intestinal.** Que ce soit dans un contexte physiologique ou pathologique, le microbiote intestinal, en produisant une myriade de composés, module le processus douloureux, l'inflammation, ainsi que les aspects comportementaux, en empruntant 3 grandes voies. Tout d'abord, la voie immunitaire : le microbiote intestinal communique activement avec le système immunitaire à proximité de la muqueuse intestinale. Ensuite, la voie endocrine, en modulant l'activation de l'axe corticotrope. Enfin, la voie nerveuse, avec laquelle elle interagit de façon plus ou moins directe et module le processus douloureux mais aussi les aspects psychologiques. Une dysbiose du microbiote intestinal peut provoquer une perturbation de ces voies de communication et peut être à l'origine de certains symptômes tels que l'hypersensibilité viscérale ou encore, l'anxiété et la dépression. *CRF* : corticolibérine ; *HHC* : axe hypothalamo-hypophysaire-cortico-surrénalien.

La dopamine est un neurotransmetteur sécrété par les systèmes monoaminergiques jouant un rôle dans la motivation, la concentration et la motricité. Une carence en dopamine est associée au développement de dépression. De la même façon, la sécrétion de dopamine mais aussi les enzymes et les transporteurs de la voie dopaminergique sont modulées par certaines souches du microbiote intestinal telles que *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus* (Hamamah *et al.*, 2022; Tsavkelova *et al.*, 2006). L'utilisation de souches probiotiques dans le rétablissement de la teneur en dopamine est une stratégie envisagée. *L. plantarum* PS128 a notamment permis d'améliorer les symptômes liés à la dépression en augmentant la teneur en dopamine dans le cerveau chez la souris (Liu *et al.*, 2016). Plusieurs modèles animaux comme l'utilisation de souris axéniques, le traitement antibiotique ou des modèles de la maladie de Parkinson ont permis de révéler l'impact du microbiote intestinal sur le SNC et sur l'activité dopaminergique. Néanmoins, des études complémentaires sont aujourd'hui nécessaires afin de connaître précisément les mécanismes sous-jacents (González-Arancibia *et al.*, 2019; Hamamah *et al.*, 2022).

De par sa capacité à produire ou à faire varier la production de neurotransmetteurs, le microbiote intestinal peut moduler les aspects comportementaux en empruntant plusieurs voies ce qui complexifie la compréhension de cet axe (**Figure 10**). Néanmoins, le potentiel thérapeutique de certaines souches bactériennes a été révélé puisque l'effet anxiolytique de souches probiotiques telles que *L. rhamnosus* ou *Bifidobacterium longum* NCC3001 (Bercik *et al.*, 2011) a été montré chez la souris (Bravo *et al.*, 2011).

### 3.3.3. Modulation de la voie de l'inflammation

L'inflammation tient une place centrale dans les pathologies intestinales mais aussi dans les comorbidités associées telles que la dépression ou le trouble anxieux. Une forte concentration en marqueurs inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , et le TNF- $\alpha$  a été mesurée au niveau sérique chez les patients atteints de dépression suggérant le rôle de l'inflammation dans le développement du trouble dépressif (Dowlati *et al.*, 2010). Les avancées dans le domaine des neurosciences ont notamment mis en évidence le lien entre les chemokines et la transmission synaptique, la plasticité et la neurogénèse dans le cas de pathologies psychiatriques (Stuart and Baune, 2014). Comme évoqué précédemment, l'implication du microbiote intestinal dans le développement de troubles anxio-dépressifs a été démontrée.

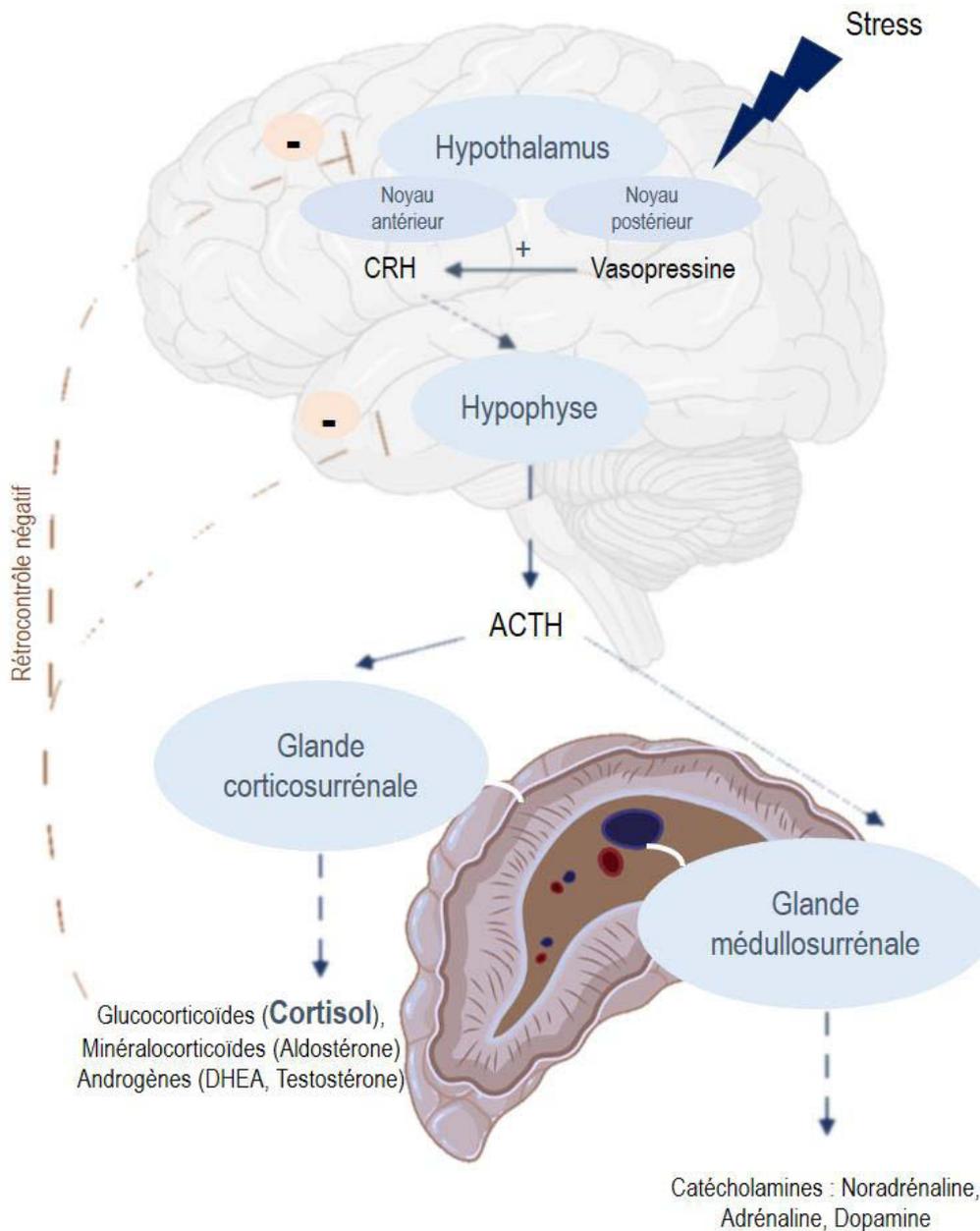


**Figure 11 : Influence du microbiote intestinal sur le métabolisme du tryptophane et sur la voie de la kynurénine.** De nombreuses pathologies telles que le SII ou les MICI se caractérisent, entre-autres, par une dysbiose du microbiote intestinal qui s'accompagne d'une perturbation du catabolisme du tryptophane. L'impact du microbiote intestinal sur le métabolisme du tryptophane est multiple. La conversion du tryptophane en kynurénine est notamment favorisée par une inflammation (cytokines) ou par un stress (cortisol) mais aussi par un microbiote intestinal perturbé. Lors d'une inflammation, le passage de la kynurénine au travers de la barrière hématoencéphalique (BHE) est favorisé, atteignant ainsi le cortex cérébral, où elle sera transformée en acide kynurénique et en acide quinolinique. Ces deux métabolites possèdent des activités neuromodulatrices. Alors que l'acide kynurénique exerce un effet neuroprotecteur, l'acide quinolinique à l'inverse, active les récepteurs NMDA et participe au développement de la dépression. Le métabolisme du tryptophane est étroitement lié à celui de la sérotonine (5-HT) qui est elle aussi impliquée dans de nombreux processus physiologiques, tant au niveau intestinal, en modulant la motilité, les sécrétions intestinales ou encore la douleur viscérale, qu'au niveau central, en intervenant dans les fonctions cognitives.

L'activation du système immunitaire par un microbiote dysbiotique peut altérer les fonctions centrales *via* l'induction d'une neuroinflammation. Le microbiote intestinal, par des mécanismes directs ou indirects impliquant la voie de l'inflammation ou *via* la synthèse de métabolites, pourrait jouer un rôle important dans la régulation du SNC et dans les désordres psychiatriques (Carlessi *et al.*, 2021). En effet, une situation de stress psychologique peut être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité intestinale favorisant le phénomène de translocation bactérienne. L'entrée de composés bactériens dans la circulation sanguine contribue à l'activation d'une réponse inflammatoire systémique et centrale (Peirce and Alviña, 2019). Au niveau central, la neuroinflammation fait suite à l'activation des cellules de la microglie, libérant alors des cytokines pro-inflammatoires au niveau cérébral ce qui affecte les composantes émotionnelles et comportementales.

L'activation du complexe de l'inflammasome et plus particulièrement de NLRP3, suite à la reconnaissance de motifs bactériens, favorise la maturation des cytokines inflammatoires et participe à ces phénomènes inflammatoires. À ce titre, une augmentation de NF- $\kappa$ B, de NLRP3 et d'IL-1 $\beta$  a été observée dans le cortex préfrontal dans un modèle de stress chronique chez le rat (Pan *et al.*, 2014). Preuve que le microbiote intestinal est capable d'agir au niveau central, l'administration de *L. plantarum* et de *B. longum* a permis de réduire les symptômes de dépression chez la souris en inhibant la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par NLRP3 (Westfall and Pasinetti, 2019). L'inflammation contribue aussi au développement de la dépression en agissant sur la voie de dégradation du tryptophane. En stimulant la production d'IDO, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) ou l'IL-6 favorisent la dégradation du tryptophane en KYNA et en QUIN. Alors que le KYNA a un effet neuroprotecteur, le QUIN possède une activité neurotoxique en activant les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et a été associé au développement de troubles dépressifs (Carlessi *et al.*, 2021; Savitz *et al.*, 2015) (**Figure 11**).

Certaines espèces bactériennes intestinales ont déjà prouvé leurs propriétés immunomodulatrices en stimulant ou en inhibant la production de cytokines pro ou anti-inflammatoires. C'est notamment le cas de *Akkermansia spp.* ou de *Blautia*, reconnues pour leurs propriétés anti-inflammatoires, et qui permettent de réduire le stress ressenti chez la souris (Wong *et al.*, 2016). Les propriétés anti-inflammatoires passent par l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B (Yousefi *et al.*, 2019). En renforçant l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et en réduisant l'inflammation, plusieurs souches probiotiques améliorent les symptômes liés à ces troubles.



**Figure 12 : Représentation générale de l'axe hypothalamo-hypophysaire cortico-surrénalien (HHC).** L'axe HHC ou axe corticotrope est un acteur essentiel des réponses biologiques au stress. Les neurones parvocellulaires du noyau para ventriculaire (PVN) synthétisent et libèrent la corticolibérine (CRH) ainsi que la vasopressine, deux hormones stimulant la synthèse de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse. Alors que le stress entraîne la libération de la CRH dans la circulation hypophysaire à partir de l'hypothalamus, la vasopressine, elle, exerce un effet potentialisateur sur la CRH pour la libération de l'ACTH. L'ACTH agit à son tour sur les cellules de la glande corticosurrénale, libérant les glucocorticoïdes (cortisol). Ces derniers interagissent avec leurs récepteurs situés dans de nombreux organes afin de réguler le métabolisme énergétique (glucidique, lipidique et protéique). En se fixant sur leurs récepteurs au niveau de l'hypophyse et du cerveau, les glucocorticoïdes peuvent bloquer leur propre sécrétion en agissant sur la libération du CRH et de l'ACTH (rétroaction négative). *ACTH* : hormone adrénocorticotrope, *CRH* : corticolibérine, *DHEA* : déhydroépiandrostérone.

C'est notamment le cas de *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus helveticus* ou de *B. longum* (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2014). Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal module l'inflammation et l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale sont aujourd'hui explorés et semblent impliquer des métabolites tels que les AGCC ou encore les métabolites du tryptophane (Martin-Subero *et al.*, 2016). Finalement, les relations établies entre le microbiote intestinal et l'inflammation sont complexes et impliquent plusieurs phénomènes concourant au développement de troubles anxio-dépressifs : la translocation bactérienne, l'activation de la réponse inflammatoire systémique et la neuroinflammation au niveau central. Une meilleure compréhension de l'impact du microbiote intestinal sur les processus inflammatoires centraux permettraient d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques, que ce soit dans le cas de la dépression comme dans d'autres pathologies telle que la maladie d'Alzheimer (Bairamian *et al.*, 2022).

#### *3.3.4. Modulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien dans le développement de trouble anxio-dépressif*

Certains mécanismes moléculaires sous-jacents à la dépression sont connus et impliquent une perturbation de l'axe HHC également connu sous le nom d'**axe corticotrope**. L'axe HHC est un acteur essentiel des réponses biologiques au stress et fait intervenir trois structures principales : le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN), la glande pituitaire ou hypophyse et la glande surrénale. En réponse à un stress physique ou psychologique (Barden, 2004), les neurones parvocellulaires du PVN synthétisent la corticolibérine (CRH) ainsi que la vasopressine, deux hormones stimulant la synthèse de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'hypophyse. Alors que le stress stimule la libération de la CRH par l'hypothalamus, la vasopressine exerce, quant à elle, un effet potentialisateur sur la CRH pour la libération de l'ACTH (Yates *et al.*, 1971). L'ACTH agit sur les cellules de la glande corticosurrénale, libérant à leur tour les glucocorticoïdes dont fait partie le cortisol. Ces derniers interagissent avec leurs récepteurs situés dans de nombreux organes afin de réguler, entre-autres, le métabolisme énergétique. Un rétrocontrôle s'opère à différents niveaux endocriniens de l'axe corticotrope. En effet, les glucocorticoïdes peuvent inhiber leur propre sécrétion en agissant sur la libération de la CRH et de l'ACTH. (Fulla *et al.*, 2009) (**Figure 12**). Ce phénomène est qualifié de rétrocontrôle négatif. Le microbiote intestinal est un acteur central dans la mise en place de cet axe, et ceci, dès les premières étapes de colonisation ayant lieu juste après la naissance.



Une perturbation lors de la colonisation du TGI par le microbiote intestinal dès les premiers mois de la vie peut notamment prédisposer au développement de troubles du comportement à l'âge adulte (Sudo *et al.*, 2004).

Un microbiote dysbiotique pourrait aussi, en augmentant la perméabilité intestinale, promouvoir une réponse inflammatoire, altérer la sécrétion de neurotransmetteurs et perturber le fonctionnement de l'axe HHC. L'ensemble de ces événements pourrait alors contribuer au développement de la dépression (Du *et al.*, 2020). De plus, une suractivation de l'axe HHC peut générer des troubles cognitivo-émotionnels tels que la réponse au stress, l'anxiété ou la dépression (Jurueña *et al.*, 2020).

Plusieurs souches bactériennes probiotiques ont révélé leur potentiel thérapeutique dans le rétablissement d'un fonctionnement normal de cet axe se traduisant par un effet bénéfique sur la dépression. C'est notamment le cas de *Bifidobacterium infantis* (Sudo *et al.*, 2004), de *Lactobacillus helveticus* R0052 et de *B. longum* R0175 (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2014), ou encore de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 (Moya-Pérez *et al.*, 2017). De par leur capacité à restaurer un fonctionnement normal de l'axe HHC, les probiotiques constituent une stratégie thérapeutique dans le traitement des troubles anxio-dépressifs.

### 3.4. Dysbiose intestinale, trouble anxio-dépressif et douleurs viscérales

Dans le cas de désordres intestinaux tels que le SII, l'origine de la douleur viscérale observée chez les patients reste incomprise puisque les examens cliniques ne permettent pas d'en définir la cause exacte. Cependant, un lien a été établi entre les douleurs viscérales, l'anxiété et la dépression. La perturbation de l'axe corticotrope est l'une des pistes explorées. L'administration d'un inhibiteur de la CRH à des patients atteints de SII améliore significativement la motilité intestinale, la sensibilité viscérale mais aussi leur humeur (Sagami *et al.*, 2004). De plus, les médecines complémentaires et alternatives telles que l'hypnothérapie ou la nutrition, par exemple, semblent améliorer la gestion de la douleur chez ces patients (Billings *et al.*, 2021; Simrén *et al.*, 2004). De manière générale, la sévérité de l'hypersensibilité viscérale, de l'anxiété et de la dépression semble également être liées. En effet, en 2013, une étude a permis d'établir une corrélation entre la sévérité des douleurs abdominales chroniques et le trouble anxio-dépressif, particulièrement chez les femmes (Walter *et al.*, 2013). Malgré cette corrélation positive, il est impossible à l'heure actuelle de dire si les troubles anxieux ou dépressifs contribuent au développement de douleurs abdominales ou bien si ces désordres psychologiques sont provoqués par ces douleurs.

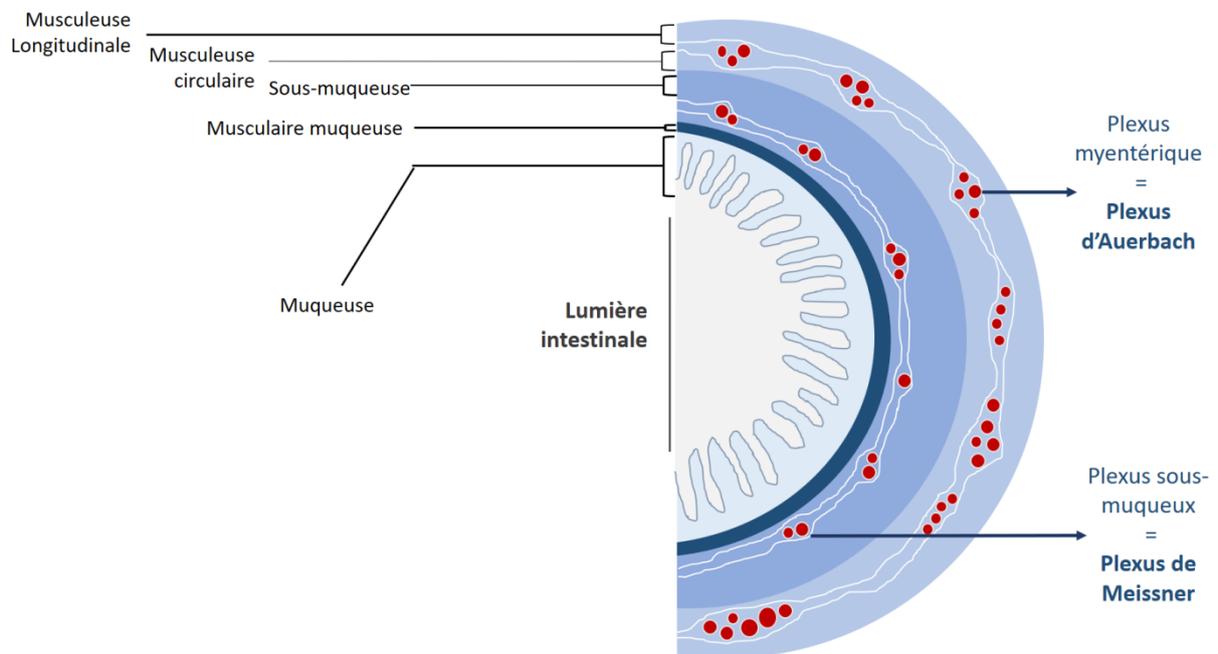


Comme évoqué précédemment, le microbiote intestinal intervient dans ce processus complexe. Dans un modèle de stress néonatal provoqué par une séparation maternelle chez la souris ou chez le rat, on remarque par exemple une dysbiose du microbiote intestinal (Enqi *et al.*, 2021), mais aussi, le développement d'une hypersensibilité viscérale associée à des troubles du comportement (Mallaret *et al.*, 2022). Ainsi, un stress subit dans l'enfance pourrait favoriser le risque de développer une hypersensibilité viscérale à travers une sensibilisation des voies de la douleur mais aussi des troubles comportementaux et contribuer au développement du SII (O'Mahony *et al.*, 2011a; Tsuda and Ogawa, 2012). Une dysbiose du microbiote intestinal peut aussi avoir un impact non négligeable sur la réponse immunitaire. Les médiateurs inflammatoires ou le cortisol, libérés lors d'une émotion négative, peuvent contribuer au développement de douleur (Morreale *et al.*, 2022). De plus, certains motifs bactériens sont capables d'activer directement ou indirectement une réponse douloureuse (Morreale *et al.*, 2022). C'est notamment le cas des LPS des bactéries à Gram négatif ou bien des acides lipothéichoïques (LTA) (van Thiel *et al.*, 2020). Cette partie sera développée dans le **chapitre II** de ce manuscrit.



#### 4. Synthèse du chapitre I

- ♣ Le microbiote intestinal entretient une relation symbiotique avec son hôte depuis les premiers mois de sa vie. Aujourd'hui, il est largement admis que le microbiote intestinal tient une place centrale dans la physiologie et dans la santé de l'hôte.☒
- ♣ Une dysbiose du microbiote intestinal constitue une prédisposition au développement de nombreuses pathologies ou à l'apparition de symptômes tels que les douleurs, qu'elles soient extra-intestinales ou viscérales comme cela est observé chez les patients atteints de SII ou de MICI.☒
- ♣ Cette dysbiose peut également perturber l'axe de communication microbiote-intestin-cerveau et être responsable de l'apparition de symptômes anxio-dépressifs ou d'une réponse exacerbée face au stress dans lesquels sa contribution a été démontrée. Ainsi, il est aujourd'hui admis que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans les douleurs viscérales et dans les comorbidités associées comme l'anxiété et la dépression *via* l'axe neuroendocrinien.
- ♣ Dans ce contexte, l'intervention du microbiote intestinal est relativement complexe et son lien direct avec le développement de la douleur est une piste récemment explorée. Un contact direct entre le microbiote intestinal et le système nerveux est l'une des pistes envisagées.



**Figure 13 : Organisation du système nerveux entérique dans une coupe transversale de tube digestif.** La paroi intestinale comprend 4 couches qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur : la séreuse, la musculuse (composée de la musculuse longitudinale et de la musculuse circulaire), la sous-muqueuse, la musculaire muqueuse et la muqueuse. Le système nerveux entérique est composé de deux plexi sous forme de ganglions répartis dans la couche musculuse (plexus myentérique) et dans la couche sous-muqueuse (plexus de Meissner). Les plexi myentériques sont situés entre les couches de muscles lisses longitudinales et les couches de muscles circulaires. Les plexi sous-muqueux sont situés entre les couches de muscles circulaires et la muqueuse.

---

## Chapitre II : Les propriétés neuromodulatrices du microbiote : un dialogue bactérie-neurone complexe

---

?

?

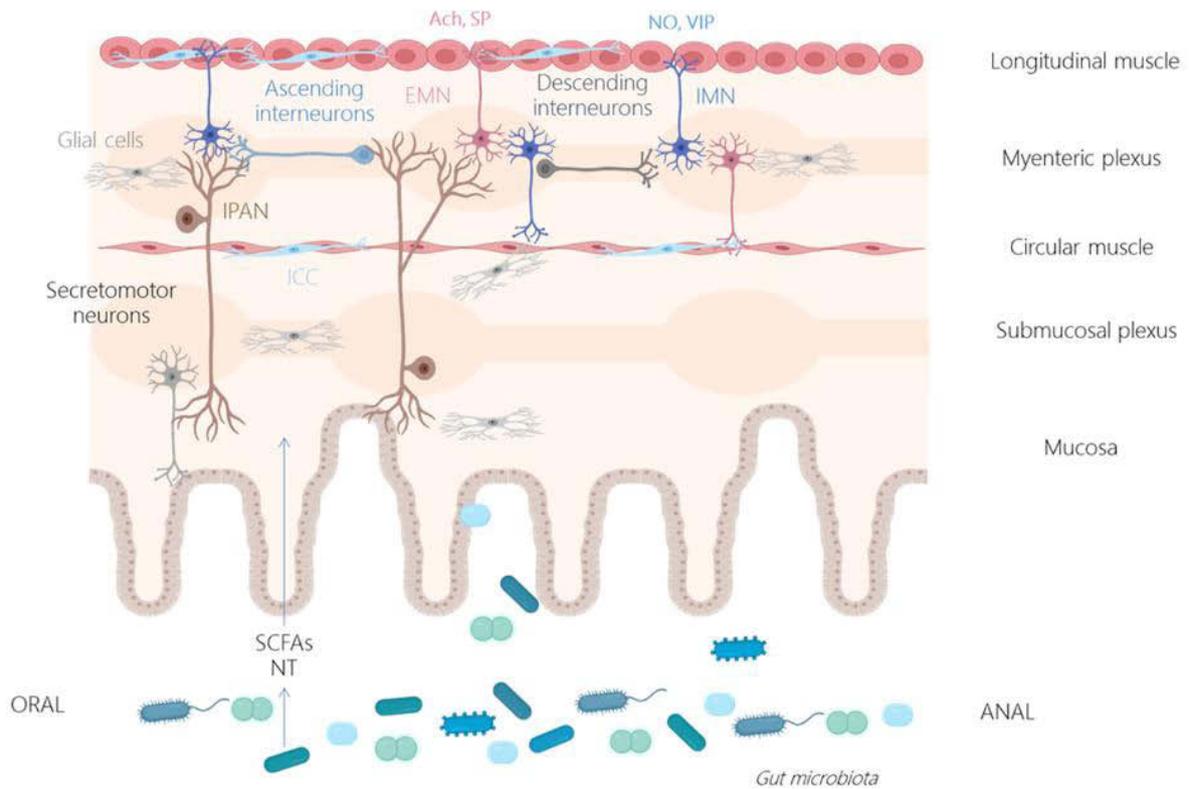
### 1. Voies nerveuses impliquées dans la douleur viscérale

#### 1.1. L'innervation intestinale

L'étude de la neurogastroentérologie est complexe du fait de l'existence de multiples réseaux neuronaux régulant la fonction intestinale. Les fonctions autonomes du tube digestif depuis l'œsophage jusqu'à l'anus sont assurées par deux plexi neuronaux alors que les sensations conscientes intestinales notamment douloureuses empruntent les voies afférentes primaires décrites précédemment. En outre, la fonction intestinale est régulée par le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique).

##### *1.1.1. Le système nerveux entérique*

Souvent qualifié de deuxième cerveau de par sa forte concentration en neurones comprise entre 400 et 600 millions de neurones (Brehmer, 2006; Furness, 2012), le SNE innerve le tube digestif et assure les différentes fonctions digestives comme le péristaltisme intestinal qui sont des contractions se propageant d'un bout à l'autre du tube digestif à l'origine du transit intestinal, ou encore la sécrétion hydroélectrolytique. Le SNE contrôle aussi la fonction de barrière épithéliale en permettant le passage de nutriments à travers l'épithélium intestinal mais aussi en agissant comme un véritable bouclier contre le passage d'agents pathogènes. Le SNE est constitué de 2 plexi ganglionnaires retrouvés tout le long du tube digestif. Le plexus myentérique, aussi appelé plexus d'Auerbach, se situe dans les muscles longitudinaux et dans les muscles circulaires (Furness, 2012) (**Figure 13**). Il assure la motilité digestive. Le plexus sous-muqueux, aussi appelé plexus de Meissner, se situe dans la sous-muqueuse et contrôle l'activité sécrétoire (Furness, 2012) (**Figure 13**). Ces plexi ganglionnaires contiennent les corps cellulaires des neurones ainsi que des cellules gliales. Leur fonctionnement est coordonné.



**Figure 14 : Structure et organisation du système nerveux entérique.** Le système nerveux entérique est composé de 2 plexi : le plexus myentérique et le plexus sous-muqueux. Ce réseau complexe est composé de cellules gliales, d'interneurones, d'IPANs et de motoneurones, régulant l'homéostasie intestinale. *Ach* : Acetylcholine ; *EMN* : Excitatory motor neuron ; *ICC* : Interstitial cells of Cajal ; *IMN* : Inhibitory Motor neuron ; *IPAN* : Primary afferent neuron, *NO*: nitro oxide ; *NT* : Neurotransmetteurs ; *SCFAs* : Short chain fatty acids ; *SP* : substance P ; *VIP* : vasoactive intestinal peptide (Fried et al., 2021).

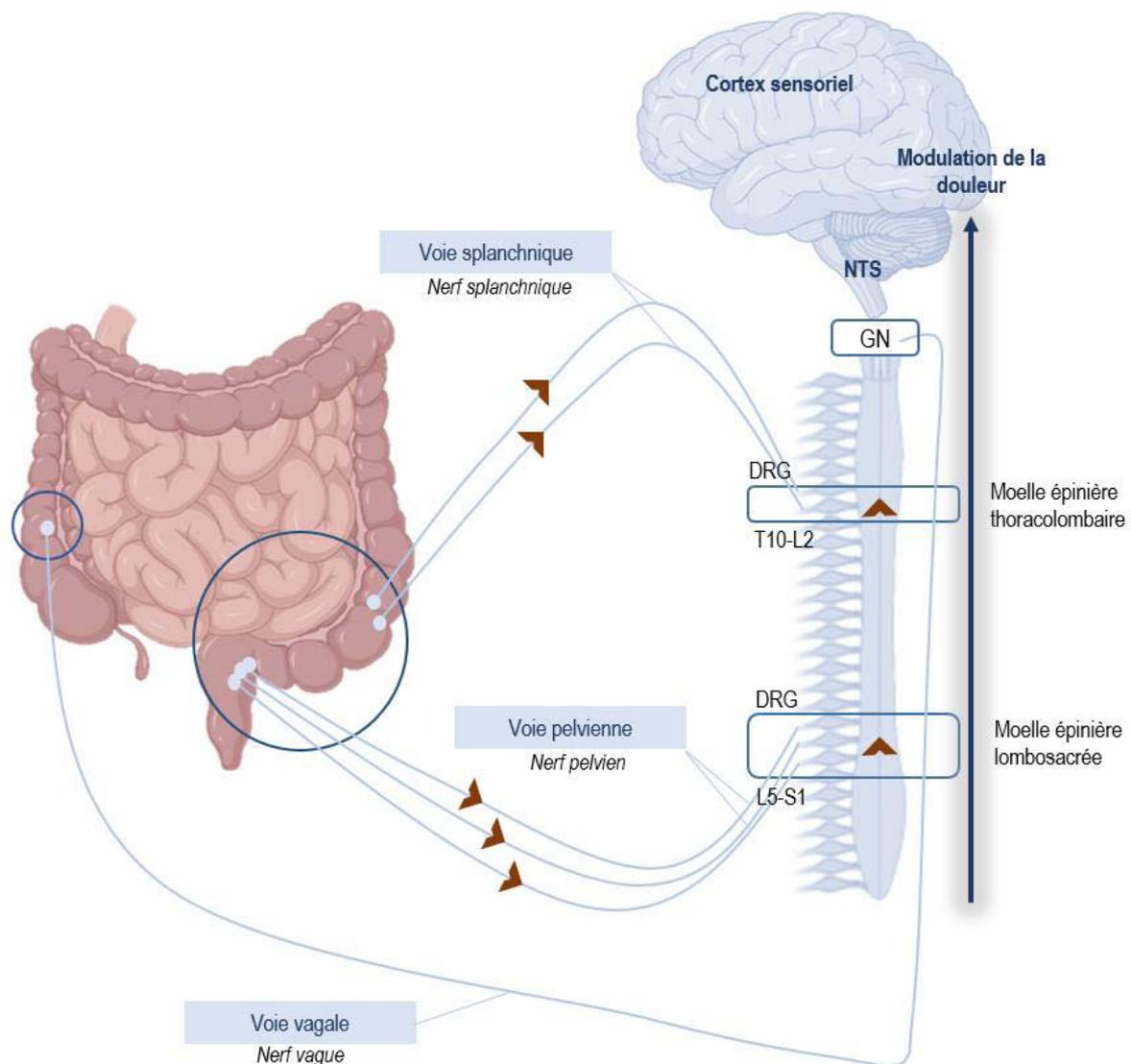
En effet, les deux plexi sont interconnectés et les cellules neuronales forment un réseau complexe de projections locales assurant ainsi les fonctions de motricité et de sécrétion intestinale. Trois grands types de neurones sont retrouvés au sein du SNE intrinsèque auxquels s'ajoutent les cellules de la glie entérique (**Figure 14**) :

- **Les neurones sensoriels**, aussi appelés neurones intrinsèques primaires afférents ou IPANs situés dans les plexi sous-muqueux et myentériques. Ces neurones sensitifs répondent aux mécanorécepteurs et aux chémorécepteurs (ou chimiorécepteurs) de la muqueuse.
- **Les motoneurones**, qui peuvent être excitateurs ou inhibiteurs (Brookes, 2001). Les neurones moteurs excitateurs libèrent des neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine et la substance P (SP) activant les cellules effectrices (Drokhlyansky *et al.*, 2020) tandis que les neurones moteurs inhibiteurs libèrent des neurotransmetteurs inhibiteurs tels que l'oxyde nitrique (NO) et le peptide vasoactif intestinal (ou VIP pour « Vasoactive Intestinal Peptide ») inhibant l'activité des cellules effectrices (Fried *et al.*, 2021) (**Figure 14**). Ces neurones innervent la musculature circulaire et longitudinale tout le long du tube digestif.
- Les IPANs et les neurones moteurs communiquent entre eux grâce aux **interneurones**, qui représentent la majorité des cellules neuronales du SNE intrinsèque (Furness, 2000, 2012; Furness *et al.*, 2004).

L'implication du SNE dans le processus douloureux n'est pas encore totalement élucidée mais il pourrait y contribuer notamment en synthétisant des neurotransmetteurs tels que la sérotonine ou des neuropeptides comme la SP et le peptide lié au gène de la calcitonine (ou CGRP pour « Calcitonin Gene Related Peptide »). Ces composés, en stimulant des neurones sensitifs proches, pourraient participer au développement d'une hypersensibilité viscérale chez des patients atteints de SII (Buhner *et al.*, 2014).

### *1.1.2. L'innervation intestinale extrinsèque*

En plus de l'innervation intrinsèque précédemment décrite, l'intestin bénéficie d'une innervation dite extrinsèque, contrôlant la fonction du SNE et assurant le lien avec le SNC. Les informations sensibles nociceptives transitent vers la moelle épinière majoritairement par les fibres C et par les fibres A $\delta$  en empruntant 3 voies anatomiques que sont les afférences vagales, les afférences thoraco-lombaires et les afférences lombosacrées.



**Figure 15 : Innervation extrinsèque du côlon.** Les informations provenant du côlon empruntent plusieurs voies représentées par les afférences vagales, les afférences thoracolumbaires et les afférences lombosacrées. Alors que les afférences vagales projettent dans le ganglion noueux (GN) sur le noyau du tractus solitaire (NTS) innervant le tractus gastro-intestinal de l'œsophage à la partie proximale du côlon *via* le nerf vague, les afférences thoracolumbaires et lombosacrées projettent respectivement vers la moelle *via* les nerfs splanchnique et pelvien projetant dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) des régions T10-L2 et L5-S1. Ces afférences permettent la détection au niveau du colorectum d'une grande diversité de stimuli mécaniques et chimiques.

Les afférences vagales projettent dans le bulbe sur le noyau du tractus solitaire (NTS) et innervent l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et la partie proximale du côlon (Brookes *et al.*, 2013) tandis que les afférences thoraco-lombaires et lombosacrées projettent vers la moelle en empruntant respectivement le nerf splanchnique et le nerf pelvien (Brierley and Linden, 2014; Brookes *et al.*, 2013). Les corps cellulaires des fibres nerveuses sont localisés dans des ganglions : dans le ganglion noueux pour les afférences provenant du nerf vague et dans les ganglions rachidiens dorsaux (GRD ou DRG pour « Dorsal Root Ganglia ») pour les afférences spinales et splanchniques. Les DRG engagés dans l'innervation colique sont situés dans les régions thoracolombaires (T10-L2) et lombosacrées (L5-S1) et correspondent respectivement à l'innervation thoracolombaire et pelvienne (Furness, 2012; Grundy *et al.*, 2019; Sadeghi *et al.*, 2018) (**Figure 15**). Les fibres afférentes nociceptives se terminent au niveau des couches I, II, V et X de la moelle épinière (Grundy *et al.*, 2019).

Les afférences spinales jouent un rôle crucial dans la transmission d'informations relatives à des désordres physiologiques, à l'origine de ballonnements, d'inconfort ou de douleur viscérale (Brierley and Linden, 2014; Sadeghi *et al.*, 2018) en détectant un grand nombre de signaux qu'ils soient mécaniques ou chimiques. Les afférences vagales transmettent généralement des informations d'ordre physiologique comme la satiété par exemple (Brierley and Linden, 2014). Les projections des afférences spinales innervent toutes les couches de la paroi colique incluant des terminaisons dans la muqueuse, dans la sous-muqueuse, mais aussi intramusculaires et vasculaires (Grundy *et al.*, 2019; Sadeghi *et al.*, 2018). Ceci permet de distinguer plusieurs types d'afférences : musculaires, mucosales, séreuses (voie splanchnique et pelvienne), méésentérique (voie splanchnique seulement) et musculaire/mucosale (voie pelvienne seulement).

Ces afférences permettent la détection, au niveau colique, d'une grande diversité de stimuli mécaniques et chimiques. Alors que les afférences mucosales détectent les distorsions de faible seuil de la muqueuse et répondent aux médiateurs endogènes, les afférences musculaires détectent les distorsions de faible seuil et les contractions. Elles induisent également une grande diversité de réponses, incluant les réponses nociceptives et répondent aux médiateurs endogènes. Les afférences musculaires/mucosales répondent à des distorsions de haut seuil et à une grande variété de médiateurs endogènes particulièrement les médiateurs inflammatoires et immunitaires (Sadeghi *et al.*, 2018).



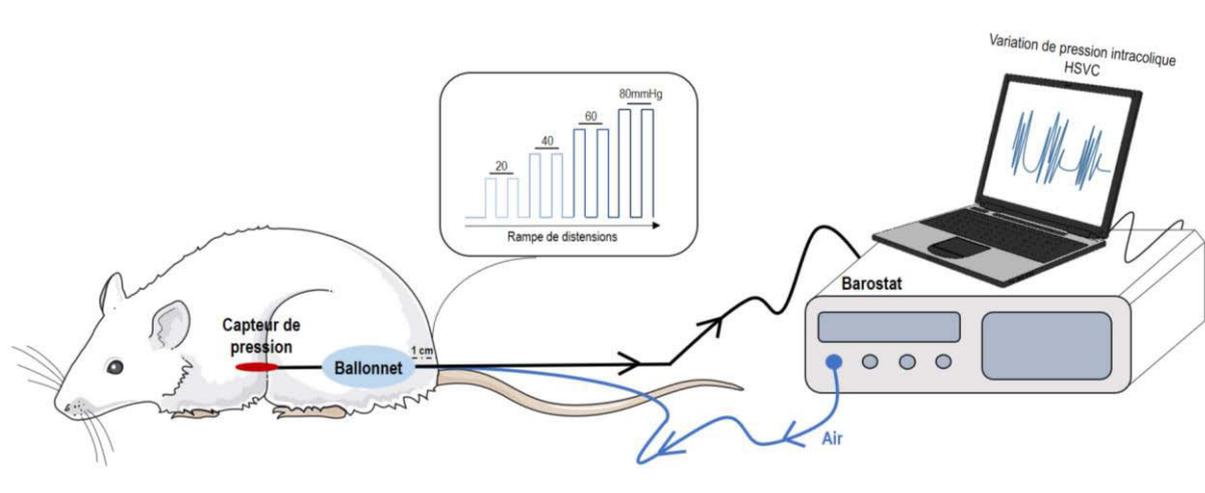
Le contrôle moteur de la fonction intestinale est assuré par les systèmes nerveux parasympathique et sympathique. Ces fibres motrices transitent auprès des fibres sensibles *via* les nerfs vagues, pelviens (parasympathique) et le nerf splanchnique (sympathique). Outre leur rôle largement décrit dans la régulation de la motilité intestinale, plusieurs études montrent aujourd'hui leur implication dans les phénomènes douloureux notamment par une activité anti-inflammatoire du système parasympathique. Ainsi l'activation des efférences vagales réduit la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages consécutive à la fixation de l'acétylcholine sur des récepteurs nicotiques portés à la membrane des macrophages (Bonaz *et al.*, 2013).

Le SNE n'est pas le seul acteur dans les fonctions digestives et le maintien de l'homéostasie intestinale puisque le SNE et l'épithélium intestinal interagissent de manière intégrée (Furness, 2015). En effet, le SNE entretient des relations étroites avec le système immunitaire. Leur proximité favorise un grand nombre d'interactions cellulaires et moléculaires. Ces communications sont principalement impliquées dans le dispositif de défense (Walsh and Zemper, 2019) mais peuvent aussi participer au processus douloureux. En effet, la contribution de la réponse inflammatoire déclenchée après reconnaissance de PAMPs dans la sensibilisation douloureuse est aujourd'hui largement décrite. Les médiateurs libérés lors d'une réaction inflammatoire tels que la 5-HT, l'histamine, la bradykinine, la SP, l'adénosine triphosphate (ATP), les prostaglandines ainsi que l'ensemble des médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines et les chimiokines (ou chémokines) sont au cœur d'interactions neuro-immunes puisqu'ils participent à la sensibilisation de neurones nociceptifs (Cook *et al.*, 2018; Guillot *et al.*, 2011) et pourraient contribuer à la chronicisation de la douleur (Matsuda *et al.*, 2019). Bien que la réponse inflammatoire soit un acteur important dans le processus douloureux, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la contribution des voies nerveuses **dans ce manuscrit.**

## 1.2. Le concept d'hypersensibilité viscérale

L'hypersensibilité viscérale se caractérise par une hyperalgie au niveau des organes internes, les viscères, et représente l'un des principaux mécanismes physiopathologiques des douleurs abdominales chroniques observées chez les patients atteints de SII ou de MICI pendant les phases de rémission (Azpiroz *et al.*, 2007). Certains patients présentent un seuil de perception douloureuse réduit impliquant deux composantes :

- Une **hyperalgie** définie comme une sensibilité excessive à un stimulus nociceptif.



**Figure 16 : Évaluation de la sensibilité colique par distension colorectale chez l'animal.** La sensibilité viscérale a été définie comme les variations de pression intracolique en réponse à la distension colorectale. Le principe de cette technique est le suivant : un ballonnet est inséré à 1 cm de la marge anale de l'animal (rat ou souris). Le ballonnet est relié au barostat dont le rôle est d'appliquer des pressions croissantes allant de 20 à 80mmHg. L'air est injecté dans le ballonnet ce qui permet de le faire gonfler dans la cavité intracolique de l'animal. Chacune de ces distensions dure 20 secondes et est espacée de la suivante de 4 minutes. Le ballonnet est relié à un capteur de pression également situé dans la cavité intracolique de l'animal. Celui-ci permet de mesurer les variations de pression intracolique en réponse aux différentes pressions appliquées. Ces variations de pression reflètent les contractions abdominales.

- Une **allodynie**, autrement dit, une douleur provoquée par un stimulus qui ne cause habituellement pas de douleur (Barbara *et al.*, 2011).

Ce concept d'hypersensibilité viscérale, introduit pour la première fois en 1973, a été montré grâce au test de distension colorectale (DCR) qui consiste au gonflement d'un ballon inséré au niveau du côlon et provoquant des douleurs chez les patients atteints de SII (Drewes *et al.*, 2020 ; Ritchie, 1973). Les individus sont qualifiés d'hypersensibles lorsqu'ils ressentent une douleur à des niveaux de pression relativement bas par rapport à des individus sains. L'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) est donc définie par un abaissement du seuil de tolérance à une stimulation douloureuse. Dans le cadre d'études précliniques, le test de DCR est également réalisé chez la souris et chez le rat, afin d'évaluer l'HSVC chez l'animal (**Figure 16**).

Il existe plusieurs types de douleurs viscérales. La **douleur viscérale aiguë**, qui se caractérise par une douleur de forte intensité, est généralement de courte durée et sa cause est connue. Bien que les douleurs viscérales soient difficilement localisables, la douleur aiguë survient, la plupart du temps, à proximité de l'organe atteint ou endommagé (Drewes *et al.*, 2020). La **douleur viscérale chronique** quant à elle, s'étend sur une durée plus longue affectant la qualité de vie des patients et l'origine n'est pas toujours connue.

La douleur viscérale est la douleur ressentie au niveau des organes internes. Contrairement à la douleur somatique, la douleur viscérale est généralement diffuse et il n'est pas toujours possible d'identifier l'organe qui en est à l'origine. Au niveau intestinal, les stimuli peuvent être variés, à la fois mécaniques (péristaltisme intestinal, distensions, étirements) ou chimiques (neurotransmetteurs ou médiateurs de l'inflammation par exemple) et peuvent provenir de diverses origines : à la fois des cellules intestinales, des cellules de l'immunité ou encore du microbiote intestinal.

### 1.3. Les récepteurs impliqués dans la douleur viscérale

Les MICI et le SII sont caractérisés par le développement d'une HSVC impliquant l'activation de récepteurs neuronaux. Cette activation peut conduire à un effet anti-nociceptif ou au contraire pro-nociceptif selon s'ils sont activateurs ou inhibiteurs et participent à la modulation de la douleur. Plusieurs récepteurs impliqués dans la modulation du processus douloureux ont été identifiés et sont rapidement devenus des cibles thérapeutiques dans la recherche de molécules antalgiques.



### *1.3.1. Les récepteurs Transcient receptor potential (TRP)*

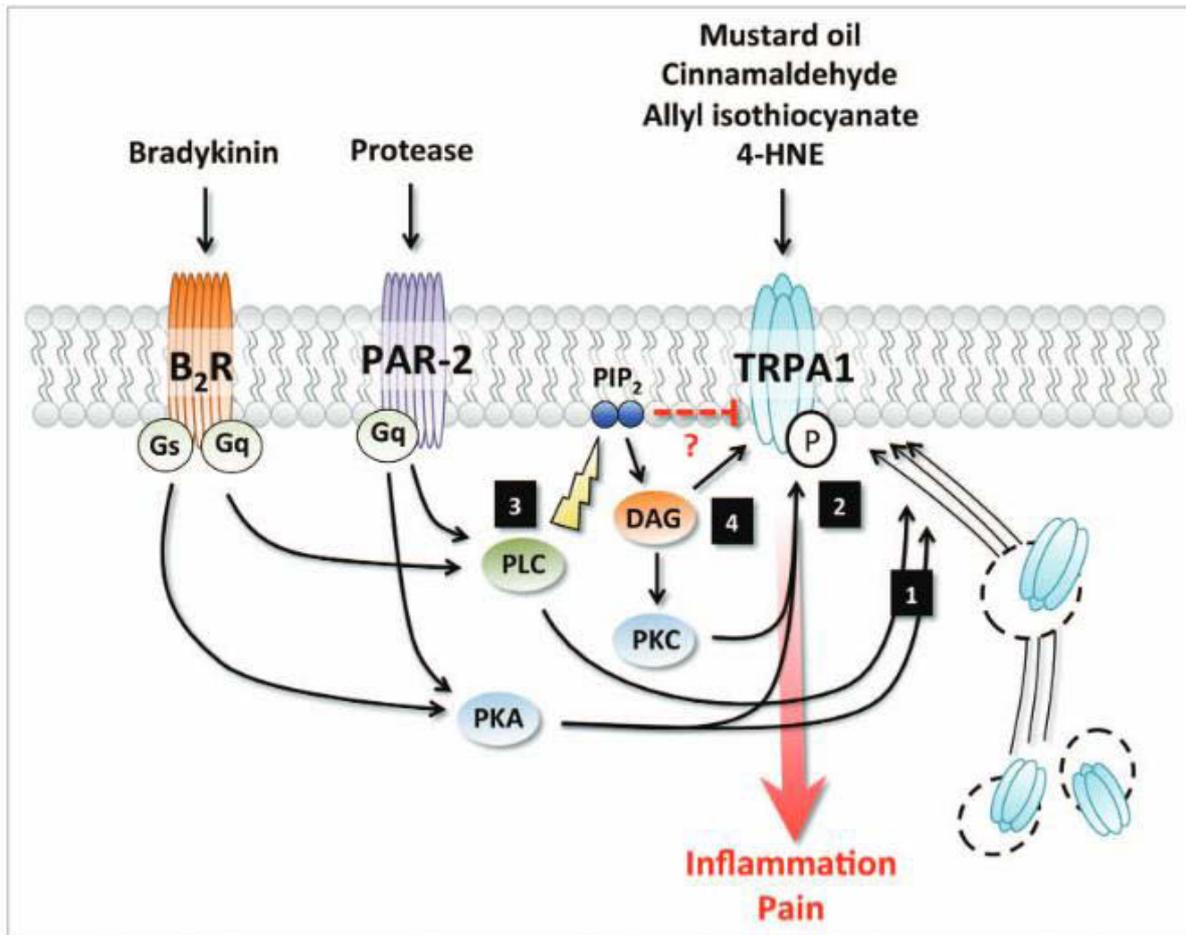
Les canaux TRP, regroupés en 7 familles, sont des canaux perméables aux cations et sont activés par des ligands très variés. Certains de ces canaux ont été identifiés dans le processus douloureux au niveau viscéral.

***Transcient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1)*** : le canal TRPV1 est activable par la chaleur ou par la capsaïcine et est retrouvé fortement exprimé par les afférences coliques (fibres A $\delta$  et fibres C). L'activation de ce canal est potentialisée par un grand nombre de composés retrouvés dans un contexte inflammatoire (Lapointe *et al.*, 2015) comme la 5-HT (Loyd *et al.*, 2013; Sugiuar *et al.*, 2004), la bradykinine (Choi and Hwang, 2018; Katanosaka *et al.*, 2008; Mistry *et al.*, 2014), les prostaglandines (Mistry *et al.*, 2014), l'histamine (Balemans *et al.*, 2014; Wouters *et al.*, 2016) ou l'ATP.

Son implication dans le développement d'une HSVC a été démontrée dans plusieurs modèles animaux de colite induite chimiquement. TRPV1 joue effectivement un rôle dans le développement de l'HSVC induite chimiquement par le 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) chez le rat (Vermeulen *et al.*, 2013). De plus, le blocage du canal TRPV1 permet de réduire l'HSVC dans un modèle de douleur aiguë non inflammatoire ainsi que dans un modèle de douleur chronique post-inflammatoire (Wiskur *et al.*, 2010). Ces effets ont aussi été évalués chez la souris. L'HSVC, évaluée par DCR, est réduite chez des souris déficientes pour le gène codant le canal TRPV1 confirmant ainsi son implication dans la douleur viscérale (Jones *et al.*, 2005).

Chez l'Homme, le niveau d'expression de TRPV1 a été corrélé positivement aux douleurs abdominales chez des patients atteints de SII (Akbar *et al.*, 2008). L'expression de TRPV1 étant retrouvée augmentée dans les biopsies de patients souffrant de douleurs abdominales, ce canal pourrait devenir une des cibles thérapeutiques dans le traitement de la douleur viscérale observée chez les patients atteints de SII ou de MICI (Akbar *et al.*, 2010).

***Transcient receptor potential cation channel subfamily A member 1 (TRPA1)*** : TRPA1, l'unique représentant de la famille des TRP-Ankyrine chez les mammifères, est exprimé par les neurones de DRG mais aussi par le ganglion du nerf vague et par le ganglion trigeminal. Ce canal répond à divers stimuli nociceptifs ainsi qu'aux faibles températures. Il est majoritairement exprimé par les fibres C non myélinisées et par les fibres A $\delta$  faiblement myélinisées (Souza Monteiro de Araujo *et al.*, 2020). Dans un contexte inflammatoire, l'activation de TRPA1 peut être modulée par plusieurs composés.



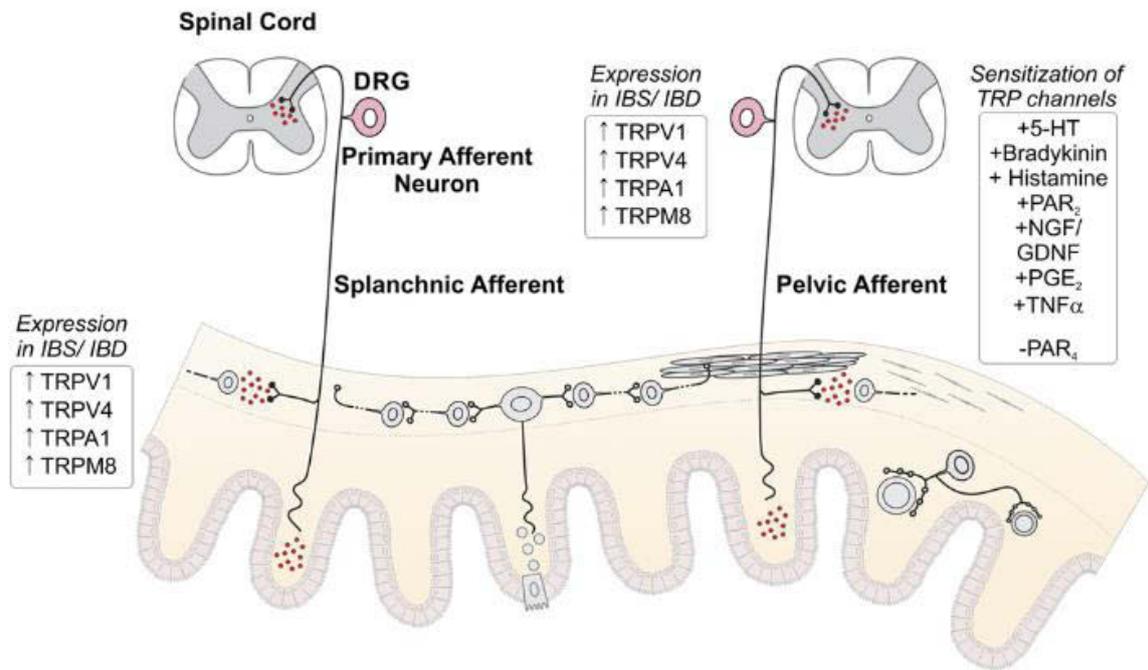
**Figure 17 : Modulation de l'activité et de l'adressage membranaire de TRPA1.** (1) l'activation de PKA et de PLC par PAR-2 ou BR2 induit l'adressage de TRPA1 vers la membrane plasmique. (2) la phosphorylation dépendante de PKA et de PKC potentialise l'activation de TRPA1. (3) l'activation de PLC par PAR-2 ou BR2 favorise l'activation de TRPA1 en libérant le canal de l'inhibition exercée par PIP<sub>2</sub>. (4) Le DAG module l'activité de TRPA1 de façon directe en activant le canal, ou indirecte en passant par la PKC. 4-HNE : 4-hydroxynonanal, B<sub>2</sub> : récepteur à la bradykinine 2, DAG : Diacylglycerol, PAR-2 : récepteur de protéase à sérine 2, PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PLC : Phospholipase C. D'après Lapointe and Altier, (2011).

C'est notamment le cas de la bradykinine ou des protéases, activant respectivement les récepteurs BR2 et le récepteur des protéases à sérine 2 (PAR-2) (Lapointe and Altier, 2011) (**Figure 17**). En effet, il est aujourd'hui admis que l'activité de la plupart des canaux appartenant aux TRP est fortement liée à celles des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Clapham, 2003). La contribution du canal TRPA1 dans la douleur inflammatoire a été largement suggérée puisqu'il contribuerait à l'effet excitateur de la bradykinine médié en partie par l'activation de la phospholipase C (PLC) (Bandell *et al.*, 2004).

Son implication dans la douleur viscérale a été démontrée dans plusieurs modèles animaux. Chez la souris par exemple, le niveau d'expression de TRPA1 dans un modèle de colite induite chimiquement au TNBS a été positivement corrélé à la sensibilité viscérale (Yang *et al.*, 2008). L'activation directe de ce canal provoque une HSVC chez la souris. À l'inverse, la délétion du gène codant le canal conduit à une réduction de l'HSVC induite chimiquement par le TNBS chez la souris (Cattaruzza *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat (Vermeulen *et al.*, 2013).

L'analyse de biopsies de côlons de patients atteints de SII n'a pas permis de mettre en évidence une hausse du niveau de composés agonistes du canal TRPA1 (Cenac *et al.*, 2015). Néanmoins, une étude bioinformatique récente a permis d'identifier le canal TRPA1 dans la liste des récepteurs jouant un rôle dans la physiopathologie du SII. En effet, TRPA1 a été retrouvé surexprimé dans les biopsies coliques de patients atteints de SII-D et souffrant de douleurs abdominales par rapport à des individus sains, faisant de ce canal un biomarqueur potentiel de la pathologie (Lin *et al.*, 2021). Bien que les données actuellement disponibles se limitent essentiellement aux modèles animaux, les premières données ont permis d'identifier le canal TRPA1 parmi la liste des nocicepteurs contribuant à la douleur viscérale faisant de lui une cible thérapeutique potentielle dans son traitement (Csekő *et al.*, 2019; Lapointe and Altier, 2011).

***Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)*** : TRPV4 est un récepteur ionotropique activé par la chaleur, la pression osmotique et par certains stimuli chimiques. Ce canal est exprimé par le SNE mais aussi par des cellules épithéliales intestinales (Cenac *et al.*, 2008). Tout comme les canaux TRPV1 et TRPA1 précédemment décrits, l'activation de ce récepteur est sensibilisée par des médiateurs de la douleur tels que la 5-HT ou l'histamine (Cenac *et al.*, 2010). En effet, dans un contexte inflammatoire, l'ouverture de ces canaux semble être facilitée *via* plusieurs mécanismes moléculaires aujourd'hui identifiés (Balemans *et al.*, 2017).



**Figure 18 : Les canaux TRP sont des médiateurs majeurs de l'inflammation intestinale et de la douleur viscérale.** L'expression des canaux TRP dans le côlon et par les neurones afférents primaires extrinsèques sont significativement augmentés dans le cas de MICI ou de SII. L'activation des canaux TRP conduit à la libération de neuropeptides pro-inflammatoires (SP, CGRP), entraînant une inflammation neurogène. La libération de ces neuropeptides au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière se traduit par une signalisation nociceptive. Les agonistes des récepteurs cellulaires, y compris les RCPG, sont libérés lors de lésions ou d'inflammation des tissus. L'activation de ces récepteurs conduit à la sensibilisation ou au recrutement de canaux TRP dans ces neurones, ce qui augmente la libération de neuropeptides et la sensation de douleur. D'après Veldhuis *et al.*, (2015).

La contribution du canal TRPV4 dans le développement de l'HSVC chez la souris a été démontrée. En effet, l'administration de 4 $\alpha$ -Phorbol 12,13-didecanoate (4 $\alpha$ PDD), un agoniste du canal TRPV4, induit une hyperalgie chez la souris se traduisant par une hausse de l'HSVC en réponse à la DCR. À l'inverse, l'HSVC est significativement réduite chez les souris déficientes pour le gène codant TRPV4 (Cenac *et al.*, 2008). De plus, le surnageant de biopsies coliques de patients atteints de SII, caractérisé par un niveau élevé d'acide epoxyecosatriénoïque (5,6-EET), un agoniste du canal TRPV4, est responsable du développement d'une HSVC chez la souris (Cenac *et al.*, 2015) témoignant de son implication dans le développement de la douleur viscérale.

Bien que peu de données soient disponibles chez l'Homme, la libération d'histamine et de 5-HT au niveau colique pourrait sensibiliser ce canal et contribuer au développement de douleurs abdominales chroniques chez les patients atteints de SII (Cenac *et al.*, 2010).

Ainsi, l'activité des récepteurs TRP est étroitement liée à celle de l'inflammation puisque qu'ils constituent des médiateurs majeurs de l'inflammation intestinale et de la douleur viscérale (**Figure 18**).

### *1.3.2. Les récepteurs à la sérotonine*

La sérotonine est majoritairement produite par les mastocytes ainsi que par les cellules entérochromaffines de l'intestin. Le microbiote intestinal influence sa synthèse, notamment en induisant sa production par les cellules intestinales ou en modifiant le métabolisme du tryptophane, précurseur de la 5-HT. Il existe 15 sous types de récepteurs à la 5-HT. Parmi eux, certains sont exprimés par des neurones situés dans les DRG chez le rat. C'est notamment le cas de 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT3B et 5-HT4 (Nicholson *et al.*, 2003) mais aussi de 5-HT2C, 5-HT3 et 5-HT7 (Pierce *et al.*, 1996).

Chez l'animal, l'implication de ces récepteurs dans les voies de la douleur a été étudiée, plus particulièrement au niveau viscéral. C'est notamment le cas du récepteur 5-HT3, fortement exprimé au niveau des afférences coliques et dont le niveau d'expression est augmenté, chez la souris, après un traitement au DSS (Matsumoto *et al.*, 2012). La sensibilisation des afférences coliques par la 5-HT semble activer le récepteur TRPV1, également impliqué dans la nociception, et participerait au développement de l'HSVC chez le rat (Qin *et al.*, 2010a) mais aussi chez la souris (Matsumoto *et al.*, 2012).



Malgré les nombreuses études menées, la voie de la 5-HT n'est pas encore bien comprise. En effet, l'altération de cette voie chez les patients atteints de SII ou de MICI pourrait contribuer au développement de douleurs abdominales mais les mécanismes sont encore mal connus (Najjar *et al.*, 2020). Les récepteurs à la 5-HT pourraient être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la douleur viscérale chez les patients atteints de SII (Binienda *et al.*, 2018).

### *1.3.3. Les récepteurs à l'histamine*

Au niveau intestinal, l'histamine est majoritairement produite par les mastocytes. Les 4 récepteurs histaminiques (HR1 à HR4) sont tous des récepteurs métabotropes, autrement dit, couplés aux protéines G. HR1, HR2 et HR4 sont exprimés au niveau colique alors que HR3 est majoritairement exprimé au niveau du SNC. L'implication de l'histamine dans le processus douloureux est spécifique du récepteur ciblé. Alors que l'activation des récepteurs HR1, HR2 et HR4 conduit à un effet pro-nociceptif, le récepteur HR3 est inhibiteur et mène à un effet anti-nociceptif. Dans un contexte inflammatoire, l'activation du récepteur HR1 conduit à une stimulation des terminaisons nerveuses sensibles alors que celle du récepteur HR3 diminue la libération d'acétylcholine, des neurokinines et des catécholamines (Devillier, 2004). Tout comme la 5-HT, l'histamine participe à un phénomène de sensibilisation des cellules nociceptives en réduisant le seuil d'activation de nocicepteurs exprimant le canal TRPV1 (Wouters *et al.*, 2016).

Chez l'animal, l'implication des récepteurs HR1 et HR4 dans le développement de douleurs viscérales a été montré dans un modèle de colite induite chimiquement au TNBS (Deiteren *et al.*, 2014). Dans un modèle de séparation maternelle, l'implication du récepteur HR1 dans le développement de l'HSVC a été démontrée chez le rat (Stanisor *et al.*, 2013). De plus, dans un contexte de SII post-infectieux (SII-PI), le récepteur HR1 pourrait jouer un rôle important dans l'HSVC chez la souris (Aguilera-Lizarraga *et al.*, 2021).

Chez l'Homme, la contribution du récepteur HR1 dans la douleur viscérale a été montrée. En effet, le surnageant de biopsies de patients atteints de SII induit l'activation de neurones de DRG prélevés chez le rat. Dans cette étude, l'activation neuronale est inhibée par le blocage du récepteur HR1 (Barbara *et al.*, 2007), témoignant de son implication dans la douleur viscérale.



### 1.3.4. Les récepteurs à la bradykinine

Les récepteurs à la bradykinine (BR), BR1 et BR2, possèdent 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G. Les récepteurs à la bradykinine sont couplés à la protéine G $\alpha$ q mais peuvent aussi recruter les protéines G $\alpha$ i, G $\alpha$ s et G $\alpha$ 12/13. Couplé à la G $\alpha$ q, l'activation du récepteur conduit à l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et en diacylglycerol (DAG) par la PLC et au relargage du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique. La bradykinine exerce de nombreuses fonctions physiologiques comme le relâchement des muscles lisses, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et participe aussi au processus douloureux. La bradykinine représente l'un des principaux médiateurs de la douleur inflammatoire, modulant l'activité de nocicepteurs et conduisant à une exacerbation de la perception de la douleur. De par son lien étroit avec d'autres canaux tels que TRPV1 et TRPA1 (Choi and Hwang, 2018), les récepteurs à la bradykinine sont devenus des acteurs clés dans la modulation de la douleur. En effet, leur activation participe au processus douloureux en interagissant avec le récepteur TRPV1 et en provoquant son activation ou sa sensibilisation *via* plusieurs mécanismes. (i) Tout d'abord, de par leur forte similarité structurelle, les produits issus du métabolisme de l'acide arachidonique tels que l'acide 12(S)-hydroxyeicosatetraénoïque ou 12(S)-HETE générés lors de l'activation de BR pourraient provoquer l'activation du canal TRPV1 (Choi and Hwang, 2018). (ii) Une autre voie d'activation du canal est possible. Lorsque le récepteur est couplé à la protéine G $\alpha$ q/11, l'activation de BR conduit à l'hydrolyse du PIP2 en DAG et en IP3 par la PLC. Ces deux composés participent à l'activation de la protéine kinase C (PKC) elle-même impliquée dans la phosphorylation du canal TRPV1. La phosphorylation du canal TRPV1 s'effectue sur plusieurs sites (résidus sérine) le rendant plus perméable aux ions calcium. (iii) Enfin, la bradykinine pourrait sensibiliser le canal TRPV1 en levant l'inhibition exercée par PIP2. Dans cette interaction, la PLC, générée lors de l'activation du BR, hydrolyse le PIP2 en IP3 et en DAG levant l'inhibition exercée par PIP2 et sensibilisant le canal TRPV1 (Choi and Hwang, 2018). L'activité du canal TRPA1, également impliqué dans la douleur, est aussi sous le contrôle de la bradykinine. Dans cette interaction, les produits issus du métabolisme de l'acide arachidonique sont capables d'activer le canal. L'implication de TRPA1 dans cette interaction médiée par la bradykinine a notamment été confirmée chez la souris (Bautista *et al.*, 2006). De la même façon que pour TRPV1, la bradykinine exerce une désensibilisation du canal TRPA1 en empruntant des voies similaires, notamment en levant l'inhibition exercée par PIP2 sur le canal (Choi and Hwang, 2018).



De plus, une surexpression des récepteurs TRPA1 et de BR2 a été observée chez des patients atteints de SII-D (Jalanka *et al.*, 2021) pouvant refléter cette coopération dans le processus douloureux.

Chez l'animal, l'implication de la bradykinine et de ses récepteurs dans le développement de la colite induite chimiquement au DSS a été montrée, notamment chez la souris (Arai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2018). Bien que la contribution des récepteurs à la bradykinine dans le développement de l'HSVC n'ait pas été démontrée de façon directe chez l'animal, une perturbation de la voie de synthèse de la bradykinine ou de ses récepteurs semble réduire significativement la sévérité de la colite induite chimiquement au DSS et au TNBS chez la souris (Wang *et al.*, 2018). Cet effet bénéfique se traduit notamment par la limitation de la perte de poids des animaux, du score de sévérité des symptômes et de l'inflammation. Dans un modèle de pancréatite, le niveau d'expression de BR1 et de BR2 a été retrouvé augmenté au niveau des neurones de DRG et corrèlerait avec l'HSVC mesurée par DCR chez la souris (Takemura *et al.*, 2011) suggérant que la bradykinine ou ses récepteurs pourraient prendre part au développement de l'HSVC chez l'animal.

Chez l'Homme, le rôle des récepteurs à la bradykinine dans les pathologies intestinales a aussi été établi. Alors que le récepteur BR2 est activé de façon ubiquitaire au niveau des muscles et des cellules neuronales, le récepteur BR1 semble être exprimé uniquement dans un contexte pathologique (Bascands *et al.*, 2003). Ceci pourrait expliquer les divergences d'expression selon les études réalisées (Brand *et al.*, 2001; Wotherspoon and Winter, 2000). Récemment, Jalanka *et al.*, (2021) ont mis en évidence une surexpression du récepteur BR2 chez des patients atteints de SII-D. Ces données coïncident également avec une étude bioinformatique récente, ayant révélé une surexpression du gène codant le récepteur BR2 chez les patients atteints de SII-D faisant de BR2 un biomarqueur potentiel de la pathologie (Lin *et al.*, 2021). Les récepteurs BR1 et BR2 sont également surexprimés au niveau intestinal chez les patients atteints de MICI plus particulièrement pendant les phases actives de la maladie (Stadnicki *et al.*, 2005). En contribuant activement à la physiopathologie du SII et des MICI et en entretenant des liens étroits avec les principaux acteurs de la douleur, les récepteurs à la bradykinine constituent des cibles thérapeutiques potentielles dans la recherche de traitements antalgiques.

**Tableau 2 : Fonctions des PAR dans la douleur viscérale, chez la souris et chez l'Homme.**  
(Adapté de Cenac, 2013).

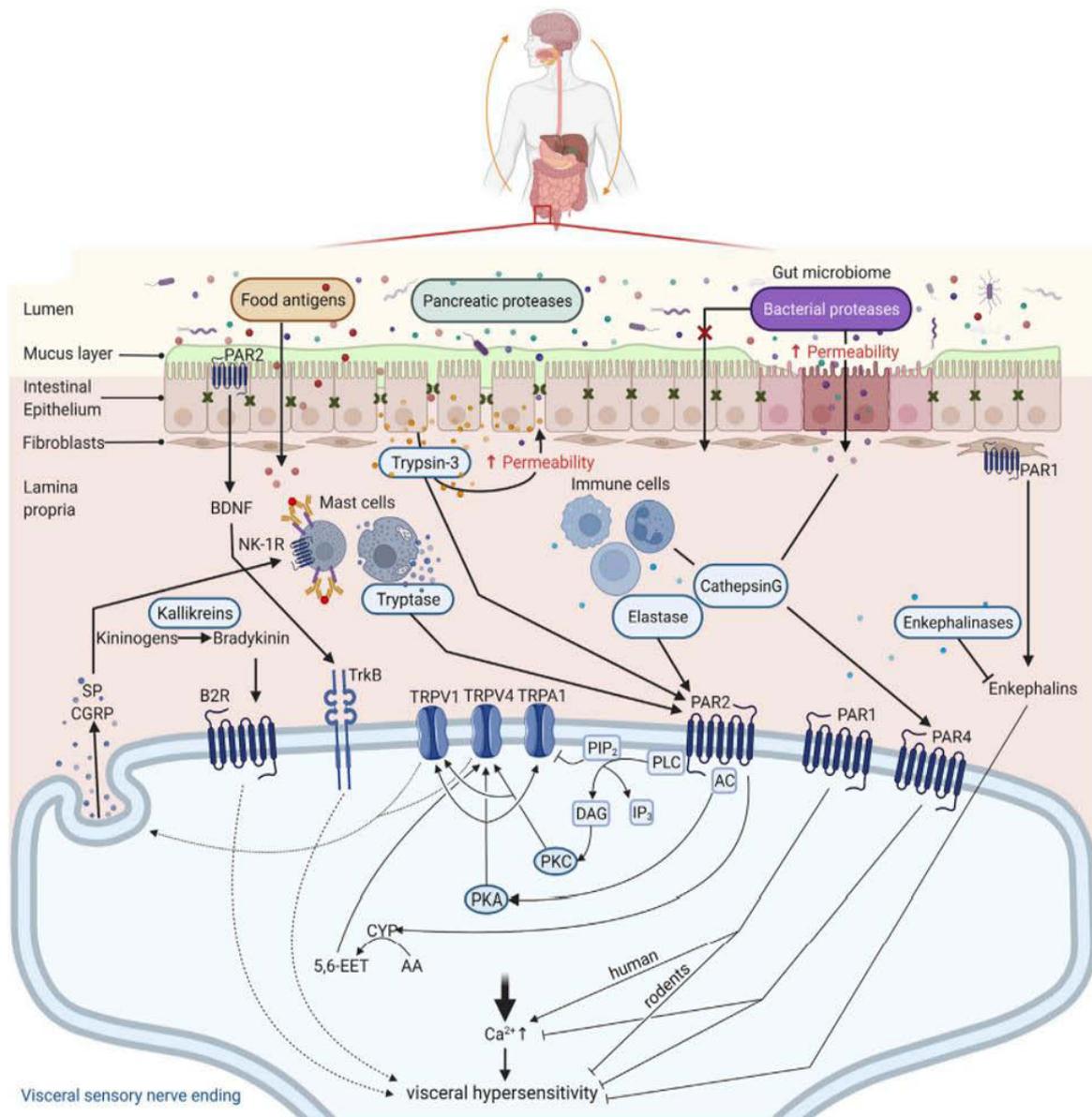
	Animal		Homme
	Neurones sensitifs	Modèles animaux	
PAR1	Pas d'effet sur les flux calciques et la libération de neuropeptides	<i>Non déterminé</i>	Activation de neurones entériques
PAR2	Augmentation des flux calciques et de la libération de neuropeptides	Induction de douleurs (pancréatique, HSVC)	Absence d'activation de neurones entériques. Les protéases libérées par les biopsies de patients SII activent PAR2 chez la souris
PAR3	<i>Non déterminé</i>	<i>Non déterminé</i>	<i>Non déterminé</i>
PAR4	Diminution de l'excitabilité	Diminution de l'HSVC	Absence d'activation des neurones entériques

### 1.3.5. Les récepteurs activés par des protéases

Les récepteurs activés par des protéases (PAR) appartiennent à une famille de 4 récepteurs activés par le clivage de leur partie N-terminale extracellulaire. Les récepteurs PAR1-4 sont exprimés par un grand nombre de types cellulaires y compris les cellules neuronales (Vergnolle, 2005). Les récepteurs PAR-1 et PAR-2 sont les plus étudiés. Alors que PAR-1 et PAR-4 sont associés à des effets anti-nociceptifs, le récepteur PAR-2 est quant à lui impliqué dans le processus douloureux et dans le développement de l'HSVC (Cenac, 2013) (**Tableau 2**). Comme c'est le cas pour d'autres récepteurs, l'activation du récepteur PAR-2 est étroitement liée à celle du canal TRPV1. En plus d'être co-exprimés par des neurones de DRG (Amadesi *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2004), ces deux récepteurs coopèrent. En effet, l'activation de PAR-2 sensibilise la réponse d'un neurone à une stimulation à la capsaïcine (Hoogerwerf *et al.*, 2001). PAR-2 est aussi co-exprimé avec d'autres récepteurs impliqués dans la nociception tels que TRPA1 et TRPV4 (Cattaruzza *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2007) favorisant ainsi le phénomène de sensibilisation neuronale.

Chez l'animal, dans un modèle murin de SII-PI induit par le pathogène *Trichinella spiralis*, l'activation de PAR-2 se traduit par une hausse de la perméabilité intestinale et de l'HSVC (Du *et al.*, 2019). Dans un modèle de douleur viscérale post-inflammatoire chez le rat, la baisse de l'HSVC a été corrélée à la baisse du niveau de PAR-2 au niveau colique (Xu *et al.*, 2018). La mise en évidence de l'implication des PAR dans le développement de l'HSVC permet d'envisager de nouveaux traitements thérapeutiques basés sur des inhibiteurs de protéases. C'est notamment le cas du FUT-175 qui a prouvé son efficacité chez la souris, en contrant l'effet pro-nociceptif d'un surnageant de patient atteint de SII (Cenac *et al.*, 2007).

Chez l'Homme, plusieurs éléments suggèrent que les protéases à sérine prennent part au processus douloureux (Decraecker *et al.*, 2022). Par exemple, les patients atteints de SII-PI présentent un taux de protéases plus élevé, responsable d'une hausse de la perméabilité intestinale. L'activation de PAR-2 serait corrélée à la sévérité des symptômes associés (Edogawa *et al.*, 2020). De plus, les biopsies de muqueuses coliques de patients atteints de SII libèrent des protéases induisant une hyperexcitabilité des neurones innervant le côlon (DRG) (Jimenez-Vargas *et al.*, 2018). Aujourd'hui, le développement d'inhibiteurs de protéases en vue de traiter l'HSVC fait face à plusieurs limites. En effet, une meilleure caractérisation de la perturbation de l'activité protéasique chez les patients SII semble indispensable afin d'envisager des traitements plus spécifiques et de limiter les effets indésirables associés.



**Figure 19 : Mécanismes contribuant au développement d'une HSVC dans le cas du SII.**

La sensibilisation périphérique de l'innervation intestinale est un mécanisme central sous-jacent à la douleur abdominale dans le SII, et les protéases émergent comme des médiateurs centraux dans ce processus. Les protéases provenant de la lumière (pancréatiques et microbiennes), des cellules épithéliales (trypsine-3) et des cellules immunitaires (tryptase, élastase et cathepsine G) participent à la perturbation de la barrière intestinale, peuvent transmettre des signaux aux nocicepteurs viscéraux et assurer la médiation de la sensibilité viscérale par l'intermédiaire d'un récepteur activé par les protéases (PAR). L'activation de PAR2 présent sur les terminaisons nerveuses des nocicepteurs viscéraux induit une HSVC *via* la sensibilisation de TRPV1, TRPV4 et/ou TRPA1 après le recrutement des protéines G $\alpha$ s ou G $\alpha$ q, selon la protéase. TRPV1 et TRPV4 présents sur les neurones sensitifs interviennent également dans la libération de la substance P (SP) et du peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP), contribuant ainsi au processus douloureux. En outre, les protéases modulent la synthèse et la sécrétion de la bradykinine et du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), composés impliqués dans la douleur inflammatoire. D'autre part, l'activation de PAR1 et de PAR4 conduit à un effet analgésique chez la souris, tandis que chez l'Homme, l'activation de PAR1 apparaît comme pro-nociceptif. Adapté de Decraecker *et al.*, (2022).

Cette spécificité est cruciale puisque les protéases jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques de l'hôte (**Figure 19**) (Decraecker *et al.*, 2022). Finalement, l'implication des protéases à sérine et de leurs récepteurs dans le développement de l'HSVC est aujourd'hui bien établie et les mécanismes moléculaires impliqués sont actuellement explorés (Decraecker *et al.*, 2022). PAR-2 pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la douleur viscérale (Cenac, 2013).<sup>17</sup>

### 1.3.6. Les récepteurs à l'acide gamma aminobutyrique (GABA)

En plus de jouer un rôle important dans le SNC, le GABA et ses deux récepteurs sont présents dans de nombreux tissus périphériques tels que le pancréas, le TGI et le système immunitaire (Auteri *et al.*, 2015; Gladkevich *et al.*, 2006). D'un point de vue de leur structure, ces 2 récepteurs sont très différents. Alors que le récepteur GABA<sub>B</sub> est un récepteur métabotrope (Pinard *et al.*, 2010), le récepteur GABA<sub>A</sub> est quant à lui un récepteur ionotrope. Ces 2 récepteurs sont perméables aux ions chlorure Cl<sup>-</sup>. Leur activation conduit donc à une entrée massive d'ions Cl<sup>-</sup> dans le compartiment cytoplasmique conduisant à une augmentation du potentiel de membrane et à une hyperpolarisation neuronale. Preuve que les récepteurs au GABA interagissent avec d'autres récepteurs, le récepteur GABA<sub>B</sub> joue un rôle dans le phénomène de désensibilisation de fibres nociceptives exprimant le canal TRPV1. Alors que les 2 sous-unités du récepteur sont indispensables à son fonctionnement, seule la sous-unité B1 est impliquée dans ce phénomène de désensibilisation (Hanack *et al.*, 2015).

Chez l'animal, l'administration de Baclofen, un agoniste du récepteur GABA<sub>B</sub>, permet de réduire significativement l'HSVC induite par une succession de DCR chez le rat (Brusberg *et al.*, 2009). À l'inverse, l'activation du récepteur GABA<sub>A</sub> aggraverait les symptômes dans un modèle de colite induite chimiquement au DSS chez la souris. Ces effets se traduisent notamment par une augmentation de la réaction inflammatoire au niveau colique, favorisée par une perturbation de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale. L'administration d'un antagoniste du récepteur, la bicuculline, a permis de contrer ces effets, confirmant l'implication du récepteur GABA<sub>A</sub> dans les propriétés délétères observées chez la souris (Ma *et al.*, 2018). Dans une étude récente, l'effet du GABA a plus particulièrement été démontré au niveau colique, dans une expérience *ex-vivo* de nerf-côlon, où les agonistes spécifiques du GABA<sub>A</sub> et du GABA<sub>B</sub> ont permis de réduire significativement l'excitabilité des afférences coliques chez la souris. À l'inverse, l'application des antagonistes spécifiques de chacun des récepteurs augmente l'excitabilité des afférences coliques.

**Tableau 3 : Exemples de récepteurs impliqués dans le développement de la douleur viscérale chronique.**

Famille	Récepteur	Implication des récepteurs dans la douleur viscérale
Récepteurs purinergiques	P2Y	Surexpression de P2Y1R chez le rat dans un modèle de SII-PI, réduction de l'HSVC par l'administration de MRS2365 (Wu <i>et al.</i> , 2017)
	P2X	Surexpression de P2X3 et P2X2/3 dans les neurones de DRG innervant le colon de rats traités au TNBS (Wynn <i>et al.</i> , 2004) Diminution de l'HSVC par l'administration de TNP-ATP (antagoniste de P2X1, P2X3 et P2X2/3) chez des rats traités à l'acide acétique (Xu <i>et al.</i> , 2008) Contribution de P2X2 et P2X3 dans l'HSVC dans un modèle murin de SII-PI (Rong <i>et al.</i> , 2009) Contribution de P2X dans la persistance de l'HSVC chez la souris dans un modèle de SII-PI (Lashermes <i>et al.</i> , 2018). Surexpression de P2X4 dans des biopsies de patients atteints de SII-D (Lin <i>et al.</i> , 2021)
Récepteurs tachykinergiques	NK1R, NK2R, NK3R	Le blocage de NK1R par un antagoniste permet de réduire l'inflammation et les dommages causés par un traitement au DSS chez la souris (Stucchi <i>et al.</i> , 2000) Les antagonistes de NK2R pourraient représenter un traitement pour les patients atteints de SII (Lecci <i>et al.</i> , 2004)
Récepteurs au glutamate	Récepteurs NMDA, AMPA et mGluR	Réduction de l'HSVC chez le rat après administration de l'antagoniste du récepteur NMDA (MK-801) (Gaudreau and Plourde 2004)
Canaux ASIC	ASIC3	Surexpression de ASIC3 chez les patients atteints de MICI (Matricon <i>et al.</i> , 2010)
Canaux ioniques dépendants du voltage	Cav	Surexpression de Cav3.2, Cav1.2 et Cav2.3 dans un modèle de colite induite chimiquement au TNBS (Qian <i>et al.</i> , 2013). Contribution de Cav3.2 dans la persistance de l'HSVC chez le rat (Picard <i>et al.</i> , 2019)
	Nav	Implication de Nav1.8 dans l'HSVC chez la souris (Erickson <i>et al.</i> , 2018) Implication de Nav 1.9 (Hockley <i>et al.</i> , 2014, 2016b)

Ces résultats suggèrent que les récepteurs au GABA sont exprimés et fonctionnels au niveau des afférences coliques et qu'ils pourraient intervenir dans la modulation de la douleur viscérale (Loeza-Alcocer *et al.*, 2019). En plus de ses propriétés neuromodulatrices, le GABA ou ses dérivés pourraient représenter une stratégie thérapeutique dans le traitement des MICI notamment en réduisant la réponse inflammatoire. C'est ce qui a été révélé dans un modèle de colite induite par l'acide acétique chez le rat dans lequel l'administration de gabapentine a permis de réduire significativement l'état inflammatoire des animaux (Motavallian *et al.*, 2021). Bien que les données précliniques soient nombreuses, peu de choses sont connues sur le traitement de la douleur viscérale chronique par le GABA ou par des analogues chez l'Homme.

### *1.3.7. Autres récepteurs impliqués dans la douleur viscérale*

En plus des récepteurs déjà décrits précédemment, d'autres récepteurs pourraient jouer un rôle dans les douleurs abdominales chroniques. C'est notamment le cas des récepteurs purinergiques (Lashermes *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2021; Rong *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2017; Wynn *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008), des récepteurs tachykinergiques (Lecci *et al.*, 2004; Stucchi *et al.*, 2000), des récepteurs au glutamate (Gaudreau and Plourde, 2004), des récepteurs activés par l'acidité (ASIC pour « acid-sensing ion channel ») (Matricon *et al.*, 2010), ou des récepteurs ioniques dépendants du voltage comme les canaux Cav (Picard *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2013) ou les canaux Nav (Erickson *et al.*, 2018; Hockley *et al.*, 2014, 2016). Ces récepteurs ne seront pas développés dans ce manuscrit, mais sont brièvement répertoriés dans le **Tableau 3**.

## **2. Interactions bactérie-neurone : un dialogue complexe**

Comme cela a déjà été évoqué dans le **Chapitre 1** de la revue bibliographique de ce manuscrit, l'immunité constitue la première ligne de défense contre les agents infectieux. La détection de pathogènes par la reconnaissance des PAMPs et l'initiation d'une réponse rapide représentent le principal processus de défense entrepris par l'hôte. Ce processus est relativement bien connu (Fukata and Abreu, 2009; McCusker and Kelley, 2013). Bien que la contribution de la réponse inflammatoire dans la sensibilisation douloureuse ait été démontrée (Bertin and Vergne-Salle, 2019; Cook *et al.*, 2018; Guillot *et al.*, 2011), nous nous intéresserons plus spécifiquement au potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal. Preuve que le système immunitaire et le système nerveux partagent un langage commun, les cellules nerveuses sont elles aussi capables de reconnaître la plupart des motifs bactériens. Au niveau intestinal, cette interaction directe entre microbiote et neurones peut conduire à la modulation de la fonction péristaltique.



En effet, de par sa proximité avec la paroi intestinale, le microbiote pourrait communiquer directement avec le SNE et modifier les contractions musculaires au niveau du côlon (Barajon *et al.*, 2009). Ochoa-Cortes *et al.*, (2010) ont montré que certains métabolites ou motifs constitutifs issus de microorganismes étaient capables de moduler l'excitabilité de neurones nociceptifs de DRG suggérant que les interactions directes entre le microbiote et le système nerveux participent à la modulation de la douleur.

Ces interactions pourraient être favorisées dans certains contextes pathologiques. Lorsque l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale est compromise, les phénomènes de translocation paracellulaire pourraient être favorisés. D'autres voies peuvent être empruntées par certains composés dont les propriétés permettent la diffusion au travers de la paroi intestinale (Pérez-Berezo *et al.*, 2017). Les mécanismes menant à l'activation de ces neurones en cas d'infection sont encore mal connus mais plusieurs composés microbiens, qu'ils soient constitutifs de leur paroi ou bien sécrétés dans leur milieu extracellulaire semblent participer à ce dialogue.

## 2.1. Une communication directe *via* des éléments constitutifs de la paroi

### 2.1.1. Les lipopolysaccharides

Le récepteur TLR4, dont l'expression a été démontrée sur des neurones sensoriels périphériques, incluant les neurones du ganglion Nœux (Hosoi *et al.*, 2005), les neurones trigéminaux exprimant TRPV1 (Diogenes *et al.*, 2011) et les neurones de DRG de souris (Acosta and Davies, 2008), participe à l'activation neuronale (Diogenes *et al.*, 2011; Ferraz *et al.*, 2011a). En effet, les LPS portés par les bactéries à Gram négatif, sont des motifs bactériens membranaires hautement réactifs capables d'activer de façon directe les neurones en interagissant avec les TLR4 (Diogenes *et al.*, 2011; Ferraz *et al.*, 2011a).

L'interaction établie entre les LPS et le récepteur TLR4 est bien documentée et cette reconnaissance peut également conduire à une sensibilisation du canal TRPV1 (Wu *et al.*, 2019b) intervenant dans les mécanismes nociceptifs (Diogenes *et al.*, 2011; Ferraz *et al.*, 2011b). Le LPS de *Escherichia coli* est aussi capable d'activer des neurones trigéminaux en interagissant avec le canal TRPV1 (Diogenes *et al.*, 2011). De plus, certains récepteurs de la famille des TRP peuvent aussi reconnaître les LPS (Alpizar *et al.*, 2017). En plus d'activer les récepteurs TLR4 et TRPV1, les LPS peuvent être reconnus par le canal TRPA1 (Meseguer *et al.*, 2014).



En effet, en modulant son activité et en induisant des perturbations dans la membrane plasmique, l'activation de TRPA1 par les LPS conduit à la libération de neuropeptides, à une inflammation locale et par conséquent à une hyperalgie (Meseguer *et al.*, 2014). Ces canaux sont des éléments clés de la réponse biologique aux LPS puisqu'ils n'ont pas besoin des TLR4 pour être activés et pour induire une inflammation neurogène. Les LPS sont aussi reconnus par le récepteur Transient Receptor Potential Melastatin member 8 (TRPM8) mais l'activation résultant de cette interaction semble dépendre de la température. En effet, alors qu'à 25°C, une large proportion de cellules s'activent sous l'action des LPS, aucun effet n'est observé à une température proche de 35°C (Boonen *et al.*, 2018).

Finalement, la reconnaissance des LPS par le système nerveux est assurée par de nombreux récepteurs favorisant ainsi la sensibilité de leur détection et permettant à l'hôte de se protéger contre les organismes pathogènes.

### 2.1.2. Les peptides N-Formylés

Les peptides N-formylés sont des motifs bactériens reconnus par les récepteurs FPRs. Ces motifs peuvent activer la réponse immunitaire, mais aussi induire une douleur en interagissant avec les nocicepteurs à proximité. C'est notamment le cas de *Staphylococcus aureus* et de *E. coli* dont les peptides N-formylés respectifs N-formyl-Met-Ile-Phe-Leu (fMIFL) et N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF), sont reconnus par FPR1. Cette reconnaissance induit une activation neuronale et conduit au développement d'une allodynie mécanique chez la souris (Chiu *et al.*, 2013a; Southgate *et al.*, 2008). Récemment, l'expression de FPR1 par les neurones entériques et son rôle dans la signalisation de la motilité intestinale ont été démontrés (Chandrasekharan *et al.*, 2019).

### 2.1.3. La flagelline

La flagelline, composant les flagelles des bactéries flagellées, est reconnue par les récepteurs TLR5 et NLRC4 (Ley and Gewirtz, 2016). L'expression de TLR5 a été observée au niveau des cellules de la microglie et des astrocytes mais aussi au niveau de la moelle épinière et des neurones de DRG. Le récepteur TLR5 est également exprimé par les neurones de DRG provenant de fibres A $\beta$  de gros diamètre et fait aujourd'hui l'objet d'études dans la recherche de traitements spécifiques des douleurs neuropathiques chimioinduites et mécaniques faisant suite à une lésion nerveuse (Xu *et al.*, 2015).



En effet, TLR5 est aujourd'hui reconsidéré en tant qu'outil pour la délivrance du composé antalgique, le QX-314, spécifiquement dirigé contre les cellules mécanoréceptrices. Cette découverte ouvre le champ à une nouvelle stratégie thérapeutique dans la recherche de traitements de la douleur chronique (Berta *et al.*, 2017).

Peu d'études ont montré l'implication du récepteur TLR5 dans le processus douloureux. Néanmoins, une étude récente a mis en évidence l'activation de neurones de petit et de moyen diamètre passant spécifiquement par TLR5 (Pan *et al.*, 2019). Bien que cette activation ait été observée dans un contexte de démangeaison, l'interaction directe entre bactérie et neurone a été révélée dans cette étude et suggère que le microbiote intestinal pourrait moduler le processus douloureux en passant par le récepteur TLR5.

## 2.2. Une communication directe *via* des métabolites bactériens sécrétés

Les microorganismes, et en particulier les bactéries intestinales, sont capables de produire un grand nombre de métabolites pouvant interagir avec le système immunitaire et/ou induire une sensation douloureuse *via* l'activation ou l'inhibition de nocicepteurs. En effet, beaucoup de ces métabolites sécrétés dans le milieu extracellulaire sont de potentiels ligands pour les nocicepteurs. C'est notamment les cas des AGCC (Morrison *et al.*, 2006), des toxines (Marion *et al.*, 2014), des neurotransmetteurs (Strandwitz, 2018) ou des polysaccharides selon la souche bactérienne considérée.

### 2.2.1. Les acides gras à chaînes courtes

Les AGCC sont libérés après digestion des fibres alimentaires par le microbiote intestinal. Plusieurs représentants du microbiote intestinal sont reconnus pour leur capacité à produire des AGCC, et plus particulièrement du butyrate, comme *F. prausnitzii*, *Eubacterium rectale* ou encore *Roseburia intestinalis* (Louis and Flint, 2017). Une attention toute particulière est portée à cet AGCC puisqu'il possède des propriétés anti-inflammatoires. En plus de ses propriétés immunomodulatrices, le butyrate interviendrait dans la modulation de la douleur. Cet effet pourrait passer par une interaction directe avec les cellules neuronales. En effet, le récepteur aux AGCC, Free fatty acid receptor 3/G-protein coupled receptor 41 (FFAR3/GPR41), est non seulement exprimé par les cellules entéroendocrines mais aussi retrouvé sur les cellules neuronales (Nøhr *et al.*, 2013) ce qui permet de supposer une possible action neuromodulatrice par le butyrate. Bien que les études menées sur l'effet anti-nociceptif du butyrate soient controversées, une étude a montré que l'effet était dose-dépendant.



En effet, alors qu'une dose élevée induirait un effet pro-nociceptif, une dose physiologique, au contraire, serait liée à un effet anti-nociceptif en réduisant la douleur viscérale dans un modèle de SII chez le rat (Nozu *et al.*, 2019). L'effet du butyrate sur la douleur pourrait aussi être indirect. Aujourd'hui, plusieurs mécanismes sont proposés : (i) en stimulant la synthèse de 5-HT, le butyrate peut réduire la perception douloureuse, (ii) en activant le canal TRPV1, le butyrate pourrait indirectement moduler la synthèse de 5-HT et enfin (iii) une activation répétée de TRPV1 pourrait conduire à une désensibilisation du canal et donc une réduction de la douleur associée (Vanhoutvin *et al.*, 2009). Enfin, le butyrate pourrait moduler l'activité neuronale en renforçant l'intégrité de la barrière intestinale, en réduisant la translocation de LPS bactériens et en limitant l'activation de la voie TLR4 (Zhou *et al.*, 2017), la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les cellules immunitaires (Lanza *et al.*, 2019) et par conséquent la douleur et l'inconfort digestif.

### *2.2.2. Les métabolites de la voie du tryptophane*

Au niveau intestinal, le métabolisme du tryptophane participe à la physiologie de l'hôte, notamment en agissant sur l'immunité et le métabolisme, sur le microbiote, sur la fonction barrière et sur le transit intestinal (Gao *et al.*, 2018). Le métabolisme du tryptophane suit 3 voies. (i) La voie principale est assurée par les cellules immunitaires de l'hôte et les cellules épithéliales intestinales *via* l'enzyme IDO1 et conduit à la synthèse de plusieurs métabolites tels que la kynurénine, le KYNA et le QUIN. (ii) Le microbiote intestinal transforme quant à lui le tryptophane en métabolites de la voie des indoles par l'action enzymatique de la tryptophanase. (iii) Enfin, une partie du tryptophane est engagée dans la voie de synthèse de la 5-HT par les cellules entérochromaffines (Agus *et al.*, 2018; Laurans and Taleb, 2021). Plusieurs de ces métabolites pourraient moduler le processus douloureux. C'est notamment le cas du KYNA, qui est une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la douleur inflammatoire (Cosi *et al.*, 2011) puisqu'il posséderait des propriétés neuromodulatrices et immunomodulatrices. En activant le récepteur couplé à la protéine G 35 (GPR35), le KYNA exerce une activité analgésique (Cosi *et al.*, 2011; Resta *et al.*, 2016). Une dysbiose du microbiote intestinal, une inflammation ou encore un stress peuvent perturber la voie de la kynurénine, en activant les enzymes impliquées dans la production de KYNA et de QUIN, deux métabolites aux propriétés neuromodulatrices (Kennedy *et al.*, 2017; Morreale *et al.*, 2022).



Il semblerait que le microbiote intestinal soit aussi impliqué dans la modulation de la production de KYNA et par conséquent impliqué une nouvelle fois dans les activités neuromodulatrices. Enfin, de manière indirecte *via* la production de butyrate, le microbiote intestinal régule négativement l'expression de l'enzyme IDO1 par les cellules épithéliales intestinales (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2018).

Plus récemment, l'implication d'indole dans le processus douloureux a été démontrée. L'indole est produit par un grand nombre de bactéries composant le microbiote intestinal. En plus d'interagir avec les cellules de l'immunité et de moduler la motilité intestinale en stimulant la synthèse de 5-HT par les cellules entérochromaffines (Ye *et al.* 2021), une étude récente a mis en évidence les propriétés neuromodulatrices de ce composé. L'indole est en effet capable d'activer des neurones de DRG de souris *via* le canal TRPA1 et participe à l'inflammation neurogène en stimulant la libération de CGRP. Cette interaction directe entre bactérie et neurone est une preuve récente de la contribution du microbiote intestinal dans le processus douloureux (Chung *et al.*, 2021).

### 2.2.3. Les neurotransmetteurs

Le microbiote intestinal produit des neurotransmetteurs comme les catécholamines (dopamine et noradrénaline), la 5-HT, le GABA, l'acétylcholine et l'histamine (Strandwitz, 2018). La production de neurotransmetteurs par les bactéries intestinales est assez bien connue notamment pour les souches appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

C'est le cas du GABA, le neurotransmetteur inhibiteur principal du SNC. La conversion du glutamate en GABA représente une stratégie d'adaptation aux environnements acides. En produisant du GABA, les bactéries abaissent ainsi leur pH intracellulaire (Feehily and Karatzas, 2013). Comme mentionné précédemment dans ce chapitre, le GABA possède des propriétés neuromodulatrices et pourrait moduler la douleur viscérale.

La 5-HT possède également des activités neuromodulatrices. La 5-HT est un messager intervenant dans le péristaltisme intestinal et est majoritairement produite par les cellules entérochromaffines. Certaines bactéries intestinales pourraient également être capables d'en produire ou de moduler sa production par l'hôte (Valles-Colomer *et al.*, 2019). La 5-HT étant reconnue par des neurones sensoriels, elle intervient, entre-autres, dans le processus douloureux. En effet, comme évoqué précédemment, les nocicepteurs exprimant les canaux de la famille des TRP sont soumis à des phénomènes de sensibilisation par certains médiateurs inflammatoires, comme c'est le cas pour la 5-HT par exemple.



Ce phénomène a d'ailleurs été observé et impliquerait le canal TRPV4 puisqu'une incubation de neurones de DRG de souris avec de la 5-HT augmente la réponse neuronale sous une stimulation au 4 $\alpha$ PDD (Cenac *et al.*, 2010). De plus, en modulant la disponibilité du tryptophane, le précurseur de la 5-HT, le microbiote pourrait jouer un rôle important dans la douleur viscérale mais les mécanismes sont encore peu connus (O'Mahony *et al.*, 2015).

#### 2.2.4. Les protéases à sérine

Les protéases à sérine participent également au dialogue bactérie-neurone. Ce sont des enzymes produites majoritairement par les cellules épithéliales intestinales et ayant de nombreuses fonctions dans la physiologie de l'hôte (coagulation, immunité, cicatrisation). Les cellules épithéliales ne sont pas les seules à pouvoir produire ces enzymes. En effet, plusieurs espèces bactériennes commensales intestinales peuvent synthétiser des protéases à sérine et participer à la physiopathologie du SII et des MICI (Steck *et al.*, 2012). C'est notamment le cas des *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC) ou encore de *Shigella* (Henderson *et al.*, 1999).

L'activation des PAR nécessite le clivage du domaine N-terminal extracellulaire par une protéase et conduit au déclenchement d'une cascade de signalisation impliquant ERK1/2 et NF- $\kappa$ B. Les récepteurs PAR sont multiples et leur activation peut conduire à l'excitabilité neuronale ou bien au contraire, à leur désensibilisation associée ou non à la baisse de la sensibilité viscérale. En effet, l'administration de l'agoniste de PAR-4 a permis de réduire l'HSVC en réponse à la DCR chez la souris (Augé *et al.*, 2009). Ainsi, les propriétés anti-nociceptives du microbiote intestinal pourraient passer par la production de protéases à sérine bactériennes en activant le récepteur PAR-4 dont l'activation conduit à un effet anti-nociceptif (Augé *et al.*, 2009; Karanjia *et al.*, 2009; Sessenwein *et al.*, 2017). L'activation directe des récepteurs PAR par le microbiote intestinal a récemment été démontrée. En effet, en produisant la protéase à sérine cathepsine G, l'espèce *F. prausnitzii* pourrait réduire l'excitabilité de neurones issus de DRG et stimulés à la capsaïcine, en activant le récepteur PAR-4 (Sessenwein *et al.*, 2017). À l'inverse, l'activation du récepteur PAR-2 par des protéases à cystéine augmente l'excitabilité de neurones du nerf vague (Pradhananga *et al.*, 2020).



### 3. Exemples de modulation de la douleur par le microbiote

#### 3.1. Propriétés pro-nociceptives de souches microbiennes

De par leur grande complexité, les microorganismes, qu'ils soient issus du microbiote intestinal ou non, possèdent et sécrètent une multitude de composés susceptibles d'interagir avec le système nerveux. Les premières preuves de l'effet pro-nociceptif de microorganismes pathogènes résultant d'une interaction directe entre bactérie et neurone (Chiu *et al.*, 2013a; Ferraz *et al.*, 2011b) suscitent aujourd'hui un vif intérêt (Defaye *et al.*, 2020; Deng and Chiu, 2021). Bien que ces données soient relativement récentes, plusieurs mécanismes d'interaction directe sont décrits.

***Staphylococcus aureus*** : *S. aureus* est capable d'induire des douleurs spontanées chez la souris en activant les nocicepteurs *via* divers facteurs de virulence et ceci, indépendamment du système immunitaire. Chiu *et al.*, (2013a) suggèrent que *S. aureus* contribuerait au processus douloureux indépendamment de la réponse inflammatoire, en activant des récepteurs exprimés par des neurones sensitifs. Cette interaction ferait intervenir des composés constitutifs de la paroi bactérienne, les peptides N-formylés, des composés bactériens thermostables, reconnus par les récepteurs FPR. Ces récepteurs, couplés à une protéine G, sont exprimés par les neurones de DRG et du ganglion trigéminal (TG). Le pathogène, en plus d'interagir *via* les composants de sa paroi, sécrète plusieurs facteurs de virulence également impliqués dans le processus douloureux et appartenant à la famille de toxines porogènes (PFT pour « Pore Forming Toxin »). Parmi elles, la toxine hémolytique ( $\alpha$ -HL) active de façon directe les neurones. En interagissant directement avec la désintégrine A et la métalloprotéinase 10 (ADAM10), la toxine forme un pore dans la membrane cellulaire et provoque l'entrée de cations. Cette entrée massive d'ions conduit à la dépolarisation de la cellule neuronale et à son activation (Blake *et al.*, 2018; Chiu *et al.*, 2013a). Bien que l'action de l' $\alpha$ -HL soit suffisante pour induire une douleur chez la souris, d'autres composés ont été identifiés et contribueraient au processus douloureux provoqué par le pathogène. C'est notamment le cas des leukocidines et des toxines phénol-solubles (PSM pour « Phenol Soluble Modulins ») capables d'interagir respectivement avec les récepteurs Darc et FPR2 et d'activer de façon directe les cellules neuronales (Blake *et al.*, 2018). Ainsi, un même pathogène est capable d'induire une sensation douloureuse en passant par plusieurs récepteurs neuronaux.

Ce pathogène opportuniste est également rencontré au niveau intestinal et augmente le risque d'infection récurrente.



Dans ce contexte, en 2020, Uhlig *et al.* ont montré que les neurones entériques étaient capables de détecter et de reconnaître ces mêmes facteurs de virulence. En effet, le surnageant de culture de *S. aureus* suscite l'activation de fibres afférentes intestinales suggérant qu'en plus de la réponse inflammatoire induite lors de l'infection, les exotoxines produites par *S. aureus* participent au processus douloureux (Uhlig *et al.*, 2020).

***Streptococcus pyogenes*** : D'autres microorganismes pathogènes sont capables de produire des toxines porogènes facilitant ainsi leur dissémination au sein du tissu infecté. En effet, dans le cas de fasciite nécrosante, une maladie infectieuse attaquant de façon progressive et rapide le tissu cutané, adipeux et sous-cutané et provoquée par le pathogène *S. pyogenes*, la douleur ressentie serait en partie due à l'activation de neurones sensitifs cutanés exprimant le canal TRPV1. Dans cette infection, le pathogène met en place une stratégie de contournement de la réponse immunitaire afin d'assurer sa survie. La toxine libérée par le pathogène, la streptolysine S (SLS), active de façon directe et non spécifique les cellules neuronales, dont font partie les nocicepteurs, en formant un pore dans la membrane. Cette activation conduit à la libération d'un neuropeptide, le CGRP, par la cellule neuronale, neutralisant le recrutement et l'activité bactéricide des cellules neutrophiles dirigées contre le pathogène et facilitant ainsi sa survie au sein du tissu infecté (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2018).

***Candida albicans*** : *C. albicans* est la principale souche incriminée dans le développement de la mycose vaginale. Une exposition répétée à l'agent pathogène conduit à une hypersensibilité à l'origine de douleur (Farmer *et al.*, 2011). *C. albicans* présente dans sa paroi des  $\beta$ -glucanes et des mannanes. Ces composés, reconnus par le récepteur TLR4 exprimé par les cellules de l'immunité, conduisent à la libération de cytokines pro-inflammatoires contribuant à l'allodynie observée chez les patientes atteintes de mycoses vaginales. Plus récemment, une équipe a noté que le pathogène, en plus de passer par la réponse immunitaire, contribuait au processus douloureux *via* l'activation du récepteur Dectin-1, exprimé par les nocicepteurs. L'activation de ce récepteur conduit à la libération de CGRP. Alors que les souris déficientes pour le récepteur ne présentent pas de sensation douloureuse suite à l'exposition au pathogène, une forte douleur est ressentie par les souris exprimant le gène de la Dectin-1 confirmant son implication dans cette interaction (Maruyama *et al.*, 2018). *C. albicans* contribuerait également à la survenue de démangeaisons, que ce soit au niveau vaginal ou cutané dans le cas de prurit, en interagissant avec le récepteur TLR7. En effet, sa paroi est également composée de zymozane capable d'activer ce récepteur (Liu *et al.*, 2010).



***Mycobacterium tuberculosis*** : Le pathogène *M. tuberculosis*, plus connu sous le nom de bacille de Koch, responsable de la tuberculose, pourrait également interagir de façon directe avec des nocicepteurs. En effet, un composé lipidique sécrété par la bactérie, le glycolipide sulfolipide-1 (SL-1) a été identifié comme responsable d'une activation neuronale en générant un flux calcique, que ce soit sur des lignées cellulaires immortalisées ou sur des neurones primaires de DRG de souris exprimant le canal TRPV1 (Ruhl *et al.*, 2020).

***Porphyromonas gingivalis*** : Les interactions entre le système nerveux et les bactéries ne se limitent pas aux neurones. En effet, alors que les LPS du pathogène *P. gingivalis* déclenchent l'activation de nocicepteurs (Ferraz *et al.*, 2011b) *via* les récepteurs TLR4 et TRPA1, ils induisent aussi la libération de neuropeptides tels que le CGRP par les cellules gliales contribuant au développement d'une douleur inflammatoire aigüe et chronique (Kaewpitak *et al.*, 2020).

### 3.2. Propriétés anti-nociceptives de souches microbiennes

Les différents membres du microbiote possèdent et produisent une myriade de composés leur permettant d'interagir avec le reste de l'organisme, les effets étant parfois pro-nociceptifs, dans le cas d'infection par des microorganismes pathogènes comme précédemment évoqué. Toutefois, il arrive parfois que ces interactions conduisent à des effets antalgiques.

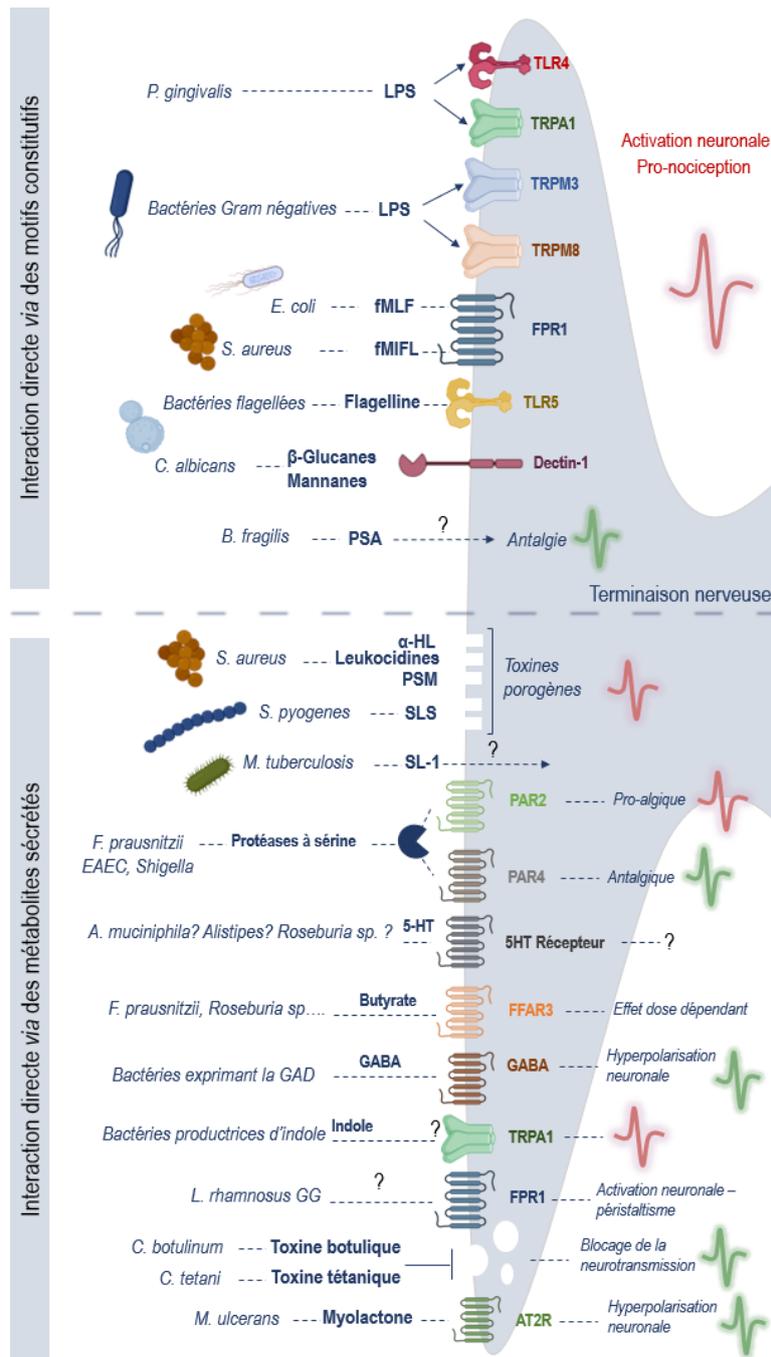
***Mycobacterium ulcerans*** : Dans le cas de l'ulcère de Buruli, affectant principalement la peau et les os, l'agent responsable *M. ulcerans* produit une toxine, la myolactone, à l'origine des lésions tissulaires et de l'inhibition de la réponse immunitaire. À l'inverse d'autres pathogènes, cette bactérie ne provoque pas de douleur lors de l'infection. La myolactone produite par cette souche, interagit avec le récepteur à l'angiotensine 2 (AT<sub>2</sub>R). L'activation de ce récepteur conduit à l'ouverture des canaux potassiques (TRAAK) conduisant à une hyperpolarisation neuronale à l'origine de ses propriétés analgésiques (Marion *et al.*, 2014). Ainsi, certains pathogènes sont capables de contourner les systèmes de défense de l'hôte en modulant la réponse immunitaire mais aussi le processus douloureux. Cette interaction est une belle démonstration de la « course à l'armement » parfois rencontrée dans la relation hôte-pathogène. La première arme de défense est représentée par le système immunitaire, capable de détecter et de lutter contre des agents pathogènes, tandis que l'agent pathogène riposte à son tour pour contourner les réponses mise en œuvre par l'hôte.



***Limosilactobacillus reuteri*** : À l'heure actuelle, de nombreux récepteurs neuronaux impliqués dans la modulation de la douleur ont été identifiés. TRPV1 représente certainement l'une des cibles privilégiées dans la recherche de composés antalgiques. En interagissant avec le canal TRPV1, *Lactobacillus reuteri* DSM pourrait réduire la réponse de neurones de DRG de rat stimulés à la capsaïcine et en modifier leurs propriétés électrophysiologiques (Perez-Burgos *et al.*, 2015). Ces propriétés neuromodulatrices pourraient être à l'origine de l'effet antinociceptif de la souche bactérienne.

***Lactococcus lactis* NCDO2118** : Certaines souches bactériennes sont reconnues pour leur capacité à convertir le glutamate en GABA et pourraient représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de douleurs viscérales. C'est notamment le cas de la souche bactérienne *Lactococcus lactis* NCDO2118 qui, en produisant du GABA au niveau intestinal, est capable de réduire l'HSVC dans un modèle de stress chez le rat (Laroute *et al.*, 2022).

***Lactocaseibacillus rhamnosus*** : Dans un autre contexte pathologique, la souche *Lactobacillus rhamnosus* (LR-2) a également prouvé son effet antalgique en réduisant la sévérité de la douleur et la destruction du cartilage dans un modèle d'arthrite induite chez le rat. Cet effet passerait notamment par une réduction de la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que la chimiokine ligand 2 (MCP-1 ou CCL2) et l'IL-1 $\beta$  et une augmentation de la production d'IL-10 et de GABA (Jhun *et al.*, 2021).



**Figure 20 : Bilan des interactions directes entre les cellules microbiennes et les récepteurs exprimés à la surface des terminaisons nerveuses.** Certains microorganismes exercent un effet neuromodulateur en interagissant directement avec les récepteurs neuronaux. Cette interaction implique la reconnaissance de motifs bactériens constitutifs spécifiques ou de métabolites sécrétés par ces microorganismes, avec les récepteurs neuronaux. L'effet résultant de cette interaction peut être activateur ou inhibiteur, pro-algique ou antalgique. LPS : Lipopolysaccharides / fMLF : peptide N-formyl-Met-Leu-Phe / fMIFL : peptide N-formyl-Met-Ile-Phe-Leu / PSA : polysaccharide A / TLR : Toll-like-receptor / TRPA1 : Transient receptor potential cation channel 1 / TRPM : Transient receptor potential cation channel subfamily M member / FPR1 : Formyl peptide receptor 1 /  $\alpha$ -HL : toxine alpha hémolysine / PSM : toxine phenol solubles / SLS : streptolysine S / SL-1 : glycolipid sulfolipid-1 / PAR : protease activated receptor / 5-HT : sérotonine / FFAR3 : Free fatty acid receptor 3 / AT2R : récepteur à l'angiotensine 2.

***Clostridium*** : D'autres toxines bactériennes ont été identifiées comme inhibant la neurotransmission et conduisant à un effet analgésique. C'est notamment le cas des bactéries productrices de la toxine botulique ou de la toxine tétanique et appartenant au genre bactérien *Clostridium*. En passant par plusieurs voies cellulaires, ces toxines sont capables de bloquer la neurotransmission et leur utilisation dans le traitement de la douleur a été envisagée (Kim *et al.*, 2015)

Bien que l'exploration des mécanismes de reconnaissance n'en soit qu'à ses débuts, il permet aujourd'hui d'identifier des couples « **ligand-récepteur** » (**Figure 20**) et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de la douleur, qu'elle soit intestinale ou extra-intestinale.



## 4. Synthèse du chapitre II

- ♣ Alors que les voies de la douleur sont relativement bien connues et qu'un certain nombre de récepteurs impliqués dans les douleurs abdominales chroniques ont été identifiés, la contribution du microbiote dans la douleur est aujourd'hui fortement suggérée.
- ♣ Les recherches indiquent que certaines souches microbiennes, bactériennes et fongiques, sont capables de moduler l'activation de neurones sensoriels en communiquant directement avec des nocicepteurs spécifiques. Ces mécanismes impliquent la reconnaissance de motifs bactériens, qu'ils soient constitutifs de la paroi ou sécrétés dans le milieu extracellulaire.
- ♣ La compréhension des mécanismes d'interaction entre bactéries et neurones est un sujet en plein essor et les chercheurs tentent aujourd'hui d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, notamment dans les cas de pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires ou neuropsychiatriques, ou plus particulièrement dans le cas de MICI ou du SII.
- ♣ Ces données ouvrent un nouveau champ d'investigation dans la recherche de stratégies thérapeutiques ciblant le microbiote intestinal. Bien que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques nécessitent aujourd'hui une meilleure compréhension de ce dialogue établi entre bactérie et neurone, plusieurs stratégies de modulation du microbiote intestinal sont actuellement explorées.

?

?

?

?

?

?



---

# Chapitre III : La modulation du microbiote intestinal comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de la douleur viscérale

---

?

?

## 1. Stratégie pharmacologique du traitement de la douleur viscérale

La prise en charge des douleurs abdominales chroniques dont souffrent les patients atteints de pathologies intestinales comme le SII ou les MICI reste insuffisante. Les traitements généralement utilisés dans ces pathologies visent à réduire la plupart des symptômes et consistent en l'administration d'antispasmodiques, de paracétamol associé à des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), à des régulateurs du transit intestinal ou encore à des antidépresseurs. Bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement pharmacologique spécifique aux douleurs viscérales, ces derniers peuvent soulager le patient.

### 1.1. Agents antispasmodiques

Les antispasmodiques, aussi appelés spasmolytiques, ont pour fonction de traiter les spasmes musculaires. En favorisant le relâchement des muscles lisses du côlon, ces composés contribuent à diminuer l'hypersensibilité viscérale et les douleurs abdominales. Leurs actions sont multiples. Dans le cas du SII, l'utilisation d'antispasmodiques est préconisée afin d'allonger le temps de transit intestinal, d'améliorer la consistance des selles tout en réduisant la fréquence de défécation. Plusieurs molécules sont actuellement prescrites dans le traitement du SII et ont déjà prouvé leur efficacité en réduisant l'hypersensibilité viscérale. C'est notamment le cas du citrate d'alverine, de la mebeverine, du bromide d'otilonium, du bromide de pinaverium ou encore du phloroglucinol (Annaházi *et al.*, 2014). Ces antispasmodiques présentent différents modes d'action. Alors que certains induisent le relâchement musculaire en inhibant les canaux calciques comme c'est le cas pour le bromure de pinavérium, d'autres se fixent aux récepteurs muscariniques comme le bromure d'otilonium. Ces traitements se sont révélés efficaces dans le cas de SII (Poynard *et al.*, 2001). Dans le cas de MICI, les antispasmodiques tels que la hyoscyamine et la dicycloamine peuvent également soulager le patient (Sinopoulou *et al.*, 2021).



Bien que ces agents soient efficaces et *a priori* sans danger pour le patient, ils peuvent néanmoins contribuer au phénomène de constipation (Zielińska, 2020). Ainsi, en plus d'être utilisés dans le traitement de la douleur viscérale, les antispasmodiques peuvent également avoir un intérêt dans la régulation du transit.

## 1.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens et le paracétamol

Chez les patients atteints de MICI, l'utilisation d'AINS est souvent préconisée. Cette classe de composés inclut notamment des molécules comme l'ibuprofène, le naproxène, le celecoxib et le meloxicam. En inhibant l'action de la cyclooxygénase COX-2 et par conséquent, la libération de prostaglandines, les AINS exercent un effet antalgique. En revanche, l'utilisation prolongée d'AINS non spécifiques peut conduire à des effets indésirables, notamment en inhibant l'activité de la COX-1 et la synthèse de prostaglandines dont le rôle est de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Feagins and Cryer, 2010). De plus, la maîtrise du dosage est un point essentiel afin d'éviter les effets indésirables tels que la formation d'ulcères ou une atteinte de la fonction rénale (Johnson and Greenwood-Van Meerveld, 2016). En combinaison avec le paracétamol, les AINS semblent avoir une efficacité accrue (Davis, 2012).

## 1.3. Régulateurs du transit intestinal

L'utilisation de laxatifs ou d'agents anti-diarrhéiques est recommandée dans certains cas afin de réguler le transit intestinal. Chez les patients atteints du SII-D, le loperamide, un anti-diarrhéique analogue structurel des opiacés, est préconisé. En interagissant avec les récepteurs aux opioïdes, le loperamide a pour action de réduire la fréquence des selles. Néanmoins, le peu de données disponibles ne permet pas de statuer sur le réel bénéfice de ce composé (Ford *et al.*, 2014). Lorsque le loperamide se révèle inefficace, le linaclotide est proposé en traitement de seconde intention. Pourtant approuvé par les instances américaines et européennes, il n'est cependant pas commercialisé en France. En plus d'agir sur le transit intestinal, le linaclotide présente un effet antalgique en stimulant la libération de guanosine monophosphate cyclique (cGMP), conduisant à l'inhibition de nocicepteurs (Castro *et al.*, 2013). L'utilisation de linaclotide présente toutefois des effets indésirables pouvant conduire à des diarrhées parfois sévères. À l'inverse, le traitement de la constipation passe par l'utilisation de composés tels que le polyéthylène glycol, un laxatif de première intention permettant d'augmenter la fréquence de défécation et dont l'efficacité a été démontrée chez l'adulte (Belsey *et al.*, 2010).



## 1.4. Antidépresseurs

L'utilisation d'antidépresseurs représente l'une des solutions thérapeutiques dans le traitement de la douleur viscérale mais reste limité aux cas les plus sévères du fait de leurs nombreux effets indésirables. Leur action est double, en agissant sur les symptômes liés à la dépression mais aussi en modulant les douleurs abdominales. Les molécules utilisées sont généralement des antidépresseurs tricycliques qui ont pour effet d'allonger le temps de transit, ou des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine ayant pour effet de réduire le temps de transit (Gorard *et al.*, 1994).

## 2. La modulation du microbiote intestinal comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de la douleur viscérale

À l'heure actuelle, les traitements pharmacologiques de la douleur viscérale sont peu spécifiques et peu efficaces et induisent, pour la plupart, des effets indésirables. La recherche de nouvelles solutions thérapeutiques est donc une priorité. Comme évoqué dans les **Chapitres I et II** de cette revue bibliographique, le microbiote intestinal est un acteur clé dans la physiologie de l'hôte et semble intervenir dans le processus douloureux *via* ses propriétés immunomodulatrices et neuromodulatrices. Le microbiote intestinal est donc devenu une cible thérapeutique dans le traitement des douleurs viscérales. Dans ce contexte, moduler la composition de son microbiote intestinal prend tout son sens puisque certaines espèces bactériennes commensales intestinales sont associées à des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte et qu'elles peuvent soulager les patients atteints de MICI ou de SII grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires ou anti-nociceptives. Plusieurs moyens existent à l'heure actuelle pour moduler son microbiote intestinal à plus ou moins long terme.

### 2.1. Le régime alimentaire

La nutrition est certainement l'un des moyens les plus accessibles dans la modulation de la composition du microbiote intestinal. Plusieurs régimes existent et chacun possède des spécificités qui lui sont propres permettant d'orienter l'évolution du microbiote intestinal. Plusieurs régimes alimentaires ont été définis selon leur composition nutritionnelle et selon leur impact sur le microbiote intestinal.

*Régime alimentaire de type occidental* se caractérise par une forte consommation de viande, de sucres et de lipides, principalement d'origine animale avec des acides gras saturés. Au contraire, dans ce régime, la consommation de fibres est réduite.



Ce régime a un impact délétère sur le microbiote intestinal caractérisé par une augmentation de l'abondance des *Alistipes*, *Bilophila* et *Bacteroides* dont certaines espèces sont reconnues pour leurs effets néfastes. C'est notamment le cas de *Bilophila wadsworthia* impliquée dans l'inflammation chronique dans le syndrome métabolique chez la souris (Feng *et al.*, 2017). Cette dysbiose est aussi caractérisée par une diminution des bactéries bénéfiques métabolisant les fibres alimentaires non digestibles. C'est notamment le cas de certaines bactéries appartenant au genre *Roseburia*, ou des espèces *E. rectale* et *Ruminococcus bromii* (David *et al.*, 2014). De nombreuses études menées chez la souris ont permis de révéler l'importance du régime alimentaire sur la composition du microbiote intestinal mais aussi son effet rapide, reproductible et réversible (Angoa-Pérez *et al.*, 2020; Carmody *et al.*, 2015; Turnbaugh *et al.*, 2009) ainsi que sur ses effets à long terme (Hasegawa *et al.*, 2020).

Contrairement au régime occidental, **le régime méditerranéen, également appelé « diète méditerranéenne »** est caractérisé par une consommation accrue de fruits, de légumes et d'huile d'olive. À l'inverse, les produits laitiers, les œufs ou la viande sont plus rarement consommés. Ce régime alimentaire influence positivement le microbiote intestinal et limiterait le développement de maladies neurodégénératives (Karstens *et al.*, 2019), de maladies neuropsychiatriques et de cancer et plus particulièrement du cancer colorectal (Schwingshackl *et al.*, 2017). Ce régime permettrait aussi de réduire le risque d'accidents cardiovasculaires (Estruch *et al.*, 2018; Tsivgoulis *et al.*, 2015).

Enfin, **le régime cétogène, également connu sous le nom de "diète cétogène"** se caractérise par un régime riche en graisses et pauvre en glucides. Il consiste à mimer le métabolisme du corps en cas de jeûne prolongé au cours duquel celui-ci va puiser dans ses réserves lipidiques qui deviennent alors la première source d'énergie pour l'organisme. En modulant la composition du microbiote intestinal, ce régime réduirait les risques d'épilepsie (Barañano and Hartman, 2008). En plus d'améliorer les symptômes dans les maladies neurodégénératives (Bostock *et al.*, 2017; Gasior *et al.*, 2006; Rawat *et al.*, 2021), ce régime permettrait d'en limiter le développement (Cavaleri and Bashar, 2018) en diminuant l'apoptose cellulaire et en réduisant le stress oxydatif. Un effet bénéfique est observé chez les patients atteints de cancer, d'autisme ou de dépression qui se traduit par une amélioration de leurs symptômes (Bostock *et al.*, 2017; Gasior *et al.*, 2006). Bien que les mécanismes d'action ne sont pas encore bien compris, il semblerait que l'impact du microbiote soit à l'origine de ces effets.



Chez la souris, l'effet de ce régime alimentaire sur le microbiote intestinal se traduit par une augmentation des bactéries appartenant aux genres *Akkermansia* et *Parabacteroides* et pourrait permettre de protéger les animaux de crises d'épilepsie (Olson *et al.*, 2018).

Dans un contexte pathologique, la modulation du microbiote intestinal présente aussi un intérêt. À ce titre, une intervention nutritionnelle basée sur un **régime appauvri en FODMAPs** est souvent préconisée chez les patients atteints du SII afin de soulager leurs symptômes et plus particulièrement l'inconfort digestif. Réduire sa consommation en FODMAPs permettrait de moduler son microbiote intestinal, de réduire l'inflammation associée à la muqueuse intestinale, et de restaurer la barrière épithéliale (Zhou *et al.*, 2018). Ces effets se traduisent par une réduction de la production de gaz de fermentation et par une baisse des douleurs abdominales ressenties par le patient (Nanayakkara *et al.*, 2016).

Bien que les mécanismes ne soient pas encore totalement connus, la modulation du microbiote intestinal par la nutrition est un moyen très accessible permettant d'améliorer différents aspects de la santé et du bien-être de l'hôte.

## 2.2. La transplantation de microbiote fécal

La TMF n'est pas une technique nouvelle. En effet, les premières traces d'utilisation de la greffe fécale proviennent de Chine et datent du IV<sup>ème</sup> siècle. Elle servait à traiter les patients ayant ingéré de la nourriture empoisonnée et souffrant de diarrhées sévères (Zhang *et al.*, 2012). La TMF consiste à administrer une préparation de matière fécale issue d'un sujet sain à un patient en vue d'exercer des effets thérapeutiques. Le microbiote fécal est un consortium complexe comprenant des microorganismes et des substances alimentaires non digérées. La seule indication validée de la TMF est l'infection récidivante à *Clostridium difficile* avec des taux de succès de l'ordre de 90% contre 30% pour le traitement standard à la vancomycine (Quraishi *et al.*, 2017). La France a été le premier pays à avoir réglementé la TMF en tant que nouveau médicament en lui offrant un cadre juridique. En effet, la loi n° 2021-1017 du 2 août 2021 relative à la bioéthique a introduit un cadre juridique spécifique à la collecte des selles destinées à la préparation de microbiote fécal à des fins thérapeutiques. Cette nouvelle législation entend ainsi considérer le microbiote fécal comme nouveau médicament.



En dehors de l'infection récidivante à *C. difficile*, la TMF ne doit être pratiquée que dans le cadre de la recherche. L'utilisation de la TMF chez des patients atteints de MICI infectés par *C. difficile* s'est révélée efficace (Newman *et al.*, 2017) et est aujourd'hui envisagée comme traitement thérapeutique. Bien que les premiers résultats de la TMF dans la RCH et dans la MC soient encourageants, les modalités relatives au traitement de ces pathologies restent à déterminer (choix du donneur, préparation de l'échantillon et mode d'administration) (Mullish *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2020). Dans le cas du SII, plusieurs études ont été menées chez l'animal et ont permis de révéler le rôle du microbiote intestinal sur le développement de l'HSVC mais aussi l'intérêt de la TMF comme solution thérapeutique dans le traitement de ce phénotype douloureux (Lucarini *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2019). En revanche, l'effet de la TMF évalué dans le cadre d'une étude randomisée, en double aveugle n'a pas permis de révéler d'effet bénéfique sur la fréquence ou la consistance des selles ni d'améliorer les douleurs abdominales chez l'Homme (Madsen *et al.*, 2021). Les résultats sont parfois contradictoires et les données ne sont pas toujours comparables du fait de la variabilité dans le protocole établi et dans le suivi des patients dans la période suivant la TMF. La TMF trouve également son intérêt dans d'autres pathologies comme le trouble de l'autisme par exemple. En effet, en réduisant de 80% les troubles gastro-intestinaux et de 25% les symptômes liés à la pathologie, la TMF pourrait être envisagée dans des contextes pathologiques autres que le SII ou les MICI (Adams *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2019).

Malgré ces données encourageantes, le transfert de microbiote fécal d'un donneur à un receveur représente des risques qu'il est nécessaire d'évaluer à travers des études plus approfondies. Au-delà du risque lié à la procédure, la TMF représente un risque biologique non négligeable. En effet, des cas d'infections ont été rapportés suite à une TMF, notamment chez des patients immunodéprimés. La TMF peut également s'accompagner du transfert de bactéries multi-résistantes. De plus, l'importance du microbiote intestinal dans le développement de pathologies très diverses est un fait établi et suscite certaines interrogations. À long terme, les effets de la TMF sont encore mal connus et plusieurs études évoquent la possibilité que la TMF pourrait être la source d'une prédisposition à certaines pathologies telles que le cancer, l'obésité ou le développement d'allergies (Gupta *et al.*, 2021). Finalement, les recherches accrues sur le microbiote intestinal et sur son rôle dans la santé de l'hôte placent la TMF comme une solution thérapeutique séduisante. Cependant, des recherches complémentaires sont nécessaires afin d'envisager son application dans le traitement de pathologies telles que le SII, les MICI, l'obésité ou l'insulino-résistance.



### 2.3. La phagothérapie

Bien que la phagothérapie soit une technique ancienne, puisqu'elle précède la découverte des antibiotiques, elle fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études et son application en santé humaine est envisagée (Liu *et al.*, 2021). Le traitement par phagothérapie consiste à exploiter l'activité biocide de virus spécifiquement dirigés contre les bactéries : les bactériophages. Au niveau intestinal, les bactériophages jouent un rôle de régulateur des populations bactériennes composant le microbiote intestinal et contribuent à maintenir un microbiote sain. Preuve que le virome fait partie intégrante du microbiome, sa composition a un impact direct sur celle du microbiote intestinal. En effet, alors que la richesse du virome est retrouvée augmentée chez les patients atteints de MICI, celle du microbiote intestinal diminue (Norman *et al.*, 2015).

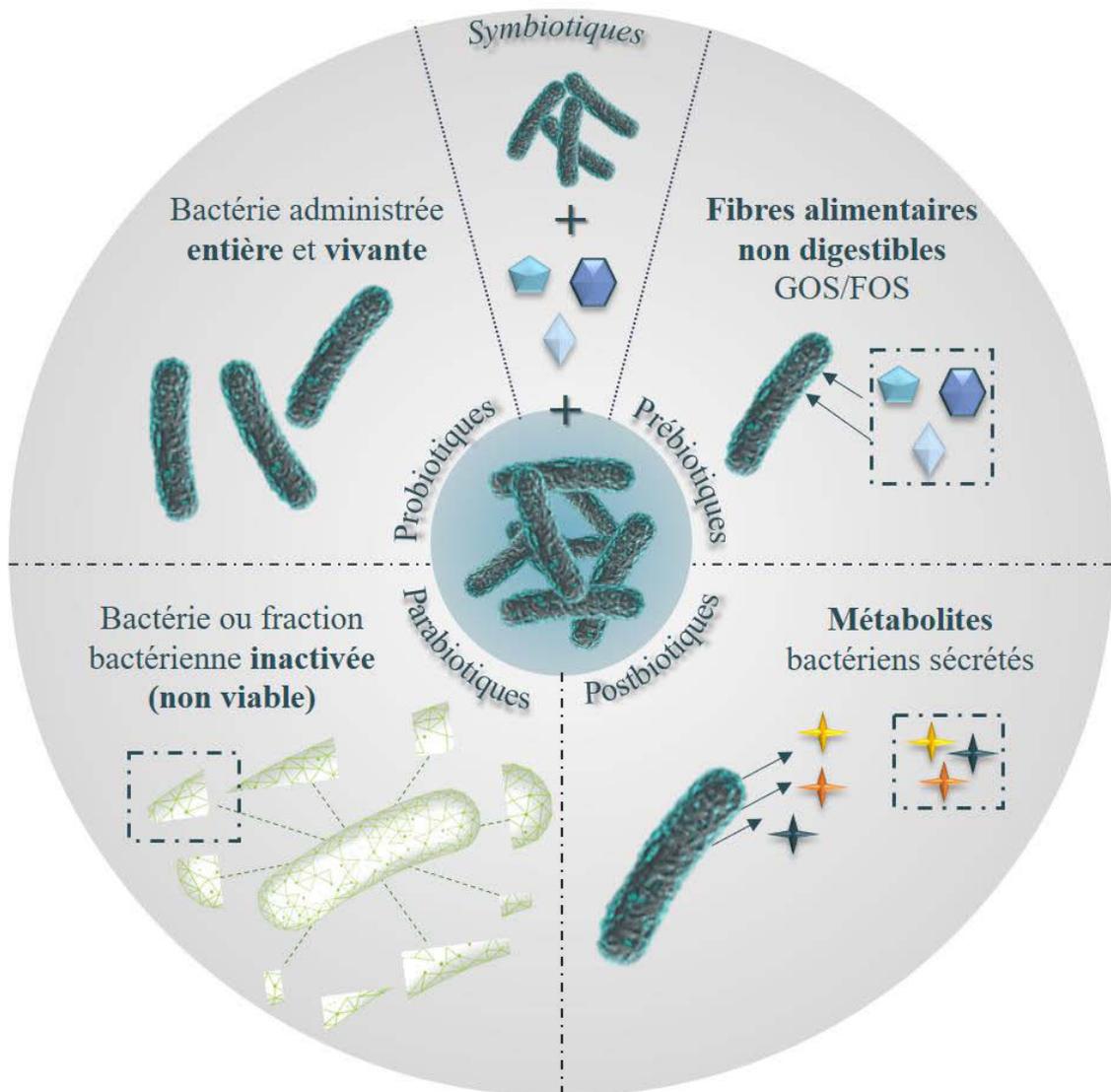
La meilleure connaissance du microbiote intestinal dans un contexte pathologique permet aujourd'hui d'orienter les recherches sur le développement de bactériophages ou de cocktails de bactériophages ciblant spécifiquement certaines espèces bactériennes. Par exemple, l'utilisation de la phagothérapie dans le traitement de MICI fait l'objet de plusieurs études. Les AIEC représentent une cible intéressante puisque leur population est retrouvée augmentée dans environ 30% des cas de MC. L'administration d'un cocktail de phages à des souris modèles pour cette pathologie a permis de réduire la concentration en AIEC et d'améliorer les symptômes (Galtier *et al.*, 2017). Les infections récidivantes à *C. difficile* sont également une problématique visée par cette nouvelle stratégie (Nale *et al.*, 2018; Sangster *et al.*, 2014).

Seule l'utilisation de phages dits lytiques est envisagée, les phages tempérés pouvant persister dans le génome et ainsi représenter un risque non maîtrisé. La phagothérapie représente aujourd'hui une stratégie thérapeutique alternative face à l'apparition d'antibiorésistances multiples. Cependant, aucun médicament à base de bactériophages ne dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France. En effet, les phages sont soumis à la réglementation des médicaments et doivent donc passer par la conduite d'essais cliniques relativement longs et onéreux. Elle n'est employée que dans de rares cas, le plus souvent à titre compassionnel, c'est-à-dire, en dernier recours pour des patients chez qui les traitements connus se révèlent inefficaces. De plus, ce traitement doit être encadré et doit être réalisé uniquement dans le cadre d'un essai clinique ou dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative délivrée par l'ANSM.



Dans ce cadre précis, l'ANSM peut délivrer une autorisation au cas par cas. L'intérêt pour cette technologie réside dans les nombreux avantages qu'elle offre : (i) son action rapide, (ii) l'absence d'effets secondaires et (iii) la spécificité de son action (dirigée spécifiquement contre une espèce bactérienne). Cependant, il reste aujourd'hui beaucoup d'inconnues quant à l'effet d'un tel traitement sur la santé humaine. En effet, en plus de moduler la composition du microbiote, la phagothérapie peut provoquer la libération d'endotoxines lors de la lyse bactérienne ayant des effets immunostimulateurs. Ainsi, la démonstration de l'absence de toxicité reste un point essentiel et nécessite une standardisation des protocoles (Liu *et al.*, 2021).

Enfin, l'exploitation de la phagothérapie combinée à l'ingénierie génétique ouvre de nouvelles pistes thérapeutiques. Le système CRISPR-Cas est un outil d'édition génétique permettant de modifier ou de supprimer des gènes microbiens spécifiques dans l'optique de moduler la composition du microbiote intestinal. Cet outil peut être utilisé à des fins diverses et variées, allant de l'élimination de bactéries multi-résistantes colonisant le TGI mais permettrait aussi d'utiliser le bactériophage comme système d'administration du gène CRISPR-Cas afin de cibler une communauté bactérienne (Nath *et al.*, 2022). Le système CRISPR-Cas présente plusieurs avantages en assurant une spécificité accrue et en ciblant des gènes très spécifiques. Ce système repose sur l'intégration de CRISPR-Cas dans le génome de bactériophages (Hatoum-Aslan, 2018). Plusieurs stratégies sont envisagées : (i) d'une part, l'utilisation du système CRISPR-Cas pourrait permettre de provoquer la mort de bactéries induite par les dommages irréversibles causés à l'ADN bactérien. La spécificité de ce système repose sur le bactériophage choisi qui reconnaîtra spécifiquement une espèce ou un groupe bactérien au sein duquel il délivrera le système. (ii) D'autre part, cette construction pourrait permettre de rétablir la sensibilité de certains pathogènes intestinaux aux traitements antibiotiques classiquement utilisés ou bien d'éliminer certains facteurs de virulence comme les gènes codants les toxines par exemple. Le pathogène verra alors sa résistance et sa pathogénicité diminuées ce qui maximisera l'effet du traitement antibiotique administré. Cette technologie permettrait ainsi de s'affranchir des multiples résistances acquises lors de ces dernières décennies et a d'ores et déjà fait ses preuves sur le pathogène multi-résistant *C. difficile* chez qui la sensibilité à l'érythromycine a été rétablie (Ingle *et al.*, 2019), mais aussi sur *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli*, et fait actuellement l'objet de nombreuses recherches (Nath *et al.*, 2022).



**Figure 21 : Distinction entre les différentes classes de produits « biotiques ».** Les probiotiques contiennent des microorganismes vivants, les parabiotiques contiennent des bactéries inactivées ou bien des fragments de bactéries, les postbiotiques (métabiotiques) exploitent les métabolites bactériens et les prébiotiques sont des composés stimulant la croissance de certaines bactéries. Enfin, les symbiotiques sont le résultat d'une association entre des probiotiques et des prébiotiques.

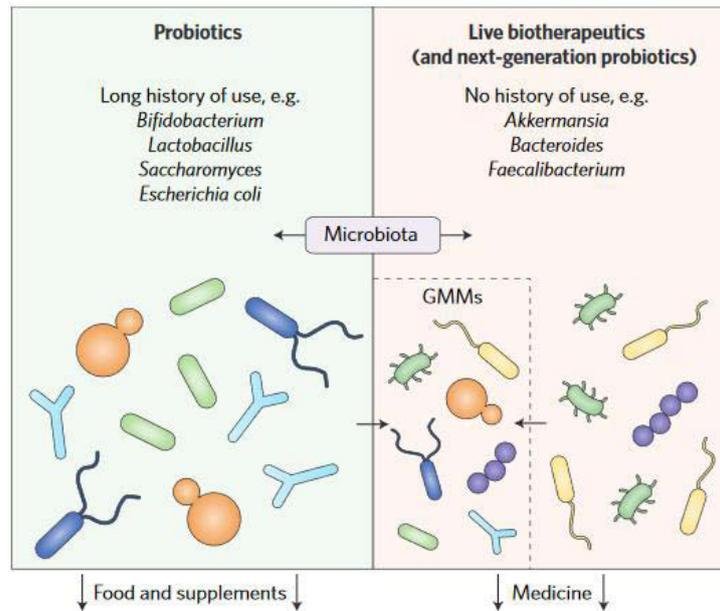
## 2.4. Les produits dits « biotiques »

Parmi l'ensemble des produits dits « biotiques » existants, une distinction est faite entre les probiotiques, les prébiotiques, les postbiotiques et les parabiotiques (**Figure 21**).

### 2.4.1. Les probiotiques

**Les probiotiques conventionnels :** L'organisation mondiale de la santé définit les probiotiques comme des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités suffisantes, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (FAO-OMS octobre 2001). En interagissant avec le microbiote intestinal et la barrière épithéliale intestinale, les probiotiques exercent de multiples effets, selon la souche utilisée, pouvant aller de bénéfices métaboliques, immunitaires, à la fonction endocrine, ou même aux fonctions cognitives et comportementales. Ces interactions peuvent passer par la production de métabolites sécrétés dans la lumière intestinale ou bien directement *via* des composés de la paroi bactérienne ou fongique. Les probiotiques interviennent dans des phénomènes de « cross-feeding » mais aussi dans des relations de compétitions nutritionnelles ou spatiales (occupation des sites d'adhésion au niveau du mucus et des cellules épithéliales) en limitant la prolifération de bactéries pathogènes, en modifiant leur environnement proche (acidification, pH), ou en produisant des substances antibactériennes (La Fata *et al.*, 2018) telles que des bactériocines ou encore des acides organiques. Toutes ces activités sont à l'origine des effets bénéfiques et contribuent au maintien de l'homéostasie intestinale et de la santé de l'hôte. La plupart des probiotiques dits « conventionnels » actuellement commercialisés, qu'ils soient d'origine bactérienne ou fongique, appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Saccharomyces* et exercent des effets bénéfiques pour l'hôte (George Kerry *et al.*, 2018). Ces probiotiques sont isolés de l'intestin humain ou bien de produits fermentés. Parmi les activités recherchées, les probiotiques peuvent moduler la réponse inflammatoire (Plaza-Díaz *et al.*, 2017) et renforcer ou restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Ohland and MacNaughton, 2010).

**Les probiotiques de nouvelle génération :** Ces vingt dernières années, les probiotiques ont gagné en popularité et constituent un marché croissant pour les secteurs de la santé et de l'industrie pharmaceutique. Le marché croissant des probiotiques va de pair avec l'émergence de nouvelles techniques de séquençage à haut débit qui ont permis d'engendrer et d'alimenter des connaissances sur le microbiote intestinal et d'identifier des souches potentiellement bénéfiques pour la santé de l'hôte. Ces souches constituent une nouvelle classe de probiotiques appelée probiotiques de nouvelle génération (NGP, Next generation probiotics).



**Figure 22 : Diagramme schématisant les différences historiques et la voie de commercialisation des probiotiques « conventionnels », des probiotiques de nouvelle génération (NGP) et des produits biothérapeutiques vivants (LBP). D'après O'Toole *et al.*, (2017).**

Les NGP se différencient des probiotiques conventionnels puisqu'en plus d'apporter des effets bénéfiques, ils seraient capables de soigner sinon de soulager certaines pathologies qu'elles soient intestinales ou extra-intestinales (**Figure 22**). Les termes de LBP pour « **live biotherapeutic product** » ou « **produits biothérapeutiques vivants** », peuvent également être rencontrés. Le LBP se définit comme « un produit biologique contenant des microorganismes vivants ainsi que d'autres ingrédients composant le LBP, mais qui n'est pas un vaccin » (Martín and Langella, 2019). La plupart des microorganismes appartenant aux NGP ou aux LBP sont isolés chez l'Homme et sont souvent strictement anaérobies. Ils sont soumis à la réglementation des nouveaux médicaments contrairement aux probiotiques conventionnels appartenant à la classe des compléments alimentaires. Ce domaine de recherche en pleine expansion attire de plus en plus d'industriels et a permis d'identifier un certain nombre de candidats tel que *Bacteroides fragilis* (Mao *et al.*, 2013), *R. intestinalis* (Zhu *et al.*, 2018), *F. prausnitzii* (Breyner *et al.*, 2017; Miquel *et al.*, 2016), *A. muciniphila* (Cani and de Vos, 2017), *Hafnia alvei* (Legrand *et al.*, 2020), *Parabacteroides goldsteinii* (Wu *et al.*, 2019a), *Clostridium butyricum* (Zhao *et al.*, 2019) ou encore *Christensenella minuta* (Mazier *et al.*, 2021) et d'identifier les différents verrous scientifiques, industriels et réglementaires associés à leur utilisation (O'Toole *et al.*, 2017).

Plusieurs espèces bactériennes font aujourd'hui l'objet d'une attention particulière. C'est notamment le cas de l'espèce *F. prausnitzii* puisque son abondance est fortement diminuée chez les patients atteints de MC (Joossens *et al.*, 2011; Sokol *et al.*, 2009; Vrakas *et al.*, 2017). De plus, les effets anti-inflammatoires (Breyner *et al.*, 2017; Quévrain *et al.*, 2016a) et anti-nociceptifs (Miquel *et al.*, 2016) de cette souche la place comme solution thérapeutique potentielle dans le traitement des MICI. C'est aussi le cas de la souche *A. muciniphila*, retrouvée diminuée chez les patients atteints de MICI (Png *et al.*, 2010; Presti *et al.*, 2019) et qui a également montré ses effets bénéfiques (Bian *et al.*, 2019; Cani and de Vos, 2017; Ottman *et al.*, 2017a; Zhai *et al.*, 2019). Bien que ces nouveaux probiotiques aient démontré des effets très intéressants chez l'animal dans le traitement de pathologies très diverses (Chang *et al.*, 2019), les mécanismes d'action sont encore peu compris et l'absence de recul sur les LBP nécessite un contrôle plus approfondi avant d'envisager leur utilisation en santé humaine (Saarela, 2019). Enfin, une évolution de la réglementation actuelle paraît inévitable afin de pouvoir exploiter tout le potentiel de ces nouveaux probiotiques en tant que médicaments innovants.



Certaines souches bactériennes, qualifiées de psychobiotiques, attirent particulièrement l'attention dans le domaine de la psychopharmacologie (Smith *et al.*, 2019) puisqu'elles pourraient, *via* la synthèse d'un grand nombre de métabolites, moduler l'axe de communication intestin-cerveau et apporter un bénéfice sur la santé mentale de l'hôte (Strandwitz, 2018). Le terme « **psychobiotique** » est relativement récent puisqu'il a été introduit et défini pour la première fois par Dinan *et al.*, en 2013. De nombreuses bactéries probiotiques utilisées traditionnellement pour traiter les désordres intestinaux présentent également des activités psychobiotiques. Parmi elles, des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent être citées mais ces propriétés sont également partagées par certaines espèces des genres *Bacillus*, *Candida*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* ou *Saccharomyces* (Misra and Mohanty, 2019). Ces psychobiotiques, de par leurs propriétés anxiolytiques, représentent une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement des troubles neuropsychiatriques ou dans le traitement des comorbidités associées à certaines pathologies intestinales telles que l'anxiété et/ou la dépression. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires puisque les mécanismes d'action ne sont pas totalement caractérisés.

#### 2.4.2. Les prébiotiques

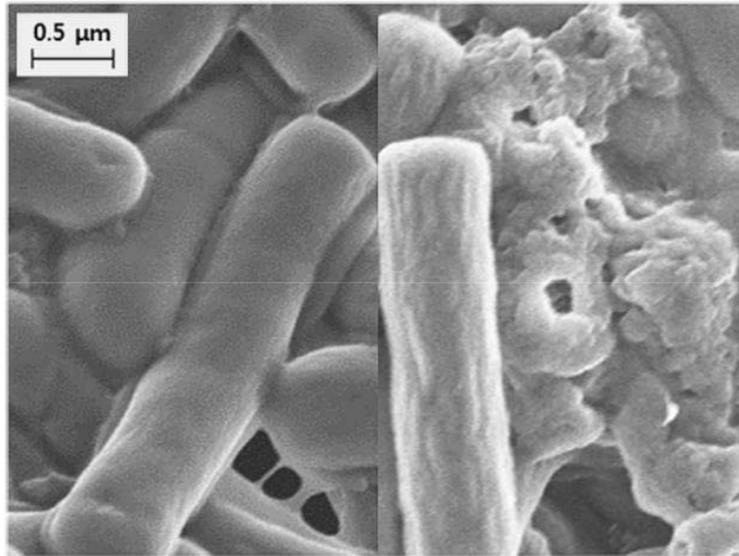
Les **prébiotiques** ont été définis comme « des ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du côlon la multiplication ou l'activité d'un ou de plusieurs groupes bactériens susceptibles d'améliorer la santé de l'hôte » (Gibson *et al.*, 2017; Schrezenmeir and de Vrese, 2001). Les prébiotiques sont généralement des fibres alimentaires non digestibles et non absorbables par l'Homme comme l'inuline, les galacto-oligosaccharides (GOS), les fructo-oligosaccharides (FOS) ou l'amidon. La plupart de ces composés sont retrouvés dans certains fruits ou légumes et leur consommation confère des bénéfices pour la santé. Ces avantages passent directement par le microbiote intestinal, capable de métaboliser ces composés complexes. La consommation d'inuline favorise la croissance de bactéries bénéfiques telles que *F. prausnitzii* ou des bactéries appartenant au genre *Bifidobacterium* comme *B. adolescentis* ou *B. bifidum* (Ramirez-Farias *et al.*, 2009). En plus de moduler la composition du microbiote intestinal, des études ont montré les bénéfices des GOS dans l'inflammation. Une étude, menée sur des personnes âgées de 65 à 80 ans, a notamment permis de mettre en évidence l'augmentation des populations de Bacteroides et de Bifidobactéries ainsi que du niveau d'IL-10, d'IL-8 après 10 semaines de traitement tandis qu'une baisse du niveau d'IL-1 $\beta$  a été rapportée (Vulevic *et al.*, 2015).



De plus, la modulation du microbiote intestinal par la consommation de prébiotiques pourrait avoir une incidence au-delà du TGI et jouer un rôle central dans la composante cognitive et comportementale. En effet, bien que les données soient parfois contradictoires, la consommation de prébiotiques semble promouvoir la diversité microbienne et permettrait d'améliorer la qualité de vie de patients atteints de troubles anxio-dépressifs (Paiva *et al.*, 2020). Enfin, leur facilité de production leur confère un avantage non négligeable. L'usage des prébiotiques est donc envisagée comme thérapie complémentaire dans plusieurs pathologies.

### 2.4.3. Les symbiotiques

Selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), un **symbiotique** est défini comme un produit contenant à la fois un ou des probiotiques ainsi qu'un ou des prébiotiques. L'association de probiotiques et de prébiotiques donne lieu à une symbiose d'où le nom de symbiotique. Les combinaisons probiotiques-prébiotiques possibles sont nombreuses. Les symbiotiques testés sont composés de souches bactériennes ou fongiques exerçant des effets bénéfiques démontrés lorsqu'elles étaient administrées seules, et de prébiotiques tels que les GOS ou les FOS. Dans certains cas, la souche probiotique peut également être combinée à un extrait végétal (Seong *et al.*, 2020). De nombreuses études ont permis de révéler l'effet bénéfique de plusieurs combinaisons sur la santé humaine, notamment chez des patients atteints d'obésité, d'insulinorésistance, de diabète de type 2 ou encore de troubles gastro-intestinaux tels que ceux observés chez les patients atteints de SII ou de MICI (Markowiak and Śliżewska, 2017). L'intérêt de combiner ces deux composants passe par deux stratégies. (i) Dans la première, la présence de prébiotiques favorise la survie et la croissance de la souche probiotique associée dans le TGI. Dans ce cas, le prébiotique agit comme un support de l'activité de la souche probiotique contenue dans la formule. (ii) Dans le deuxième cas, certains chercheurs supposent que le prébiotique n'a pas d'impact sur la souche probiotique associée mais va agir au niveau colique et favoriser la croissance de souches commensales intestinales bénéfiques ce qui aura pour conséquence de rétablir l'homéostasie intestinale. Quoiqu'il en soit, en combinant les effets bénéfiques de prébiotiques et de probiotiques, les symbiotiques représentent une piste de recherche d'intérêt dans le traitement de nombreuses pathologies puisqu'ils pourraient potentialiser l'effet des éléments qui le composent. Tout comme la majorité des produits dits « **biotiques** », la plupart des études visent à évaluer leurs effets bénéfiques dans les pathologies intestinales.



**Figure 23 : Comparaison de l'aspect de la souche bactérienne *L. rhamnosus* non traitée (à gauche) et ayant subi une tyndallisation (à droite). D'après Lee *et al.*, (2016).**

De manière générale, les symbiotiques représentent une stratégie thérapeutique intéressante puisqu'ils réduisent la sévérité des symptômes observés chez les patients atteints de SII (Seong *et al.*, 2020; Simon *et al.*, 2021; Skrzydło-Radomańska *et al.*, 2020).

#### 2.4.4. Les parabiotiques

Les **parabiotiques**, aussi appelés « **ghost probiotics** » ou **probiotiques inactivés** (Martín and Langella, 2019) sont des cellules de probiotiques inactivées (non-viables) entières ou fragmentées, contenant des composants cellulaires tels que des peptidoglycanes, des LPS ou des LTA. Il existe plusieurs méthodes d'inactivation comme les ultra-violetts (UV), les rayons gamma (irradiation), le traitement chimique ou la sonication mais aujourd'hui, l'inactivation thermique semble être la méthode privilégiée (Cuevas-González *et al.*, 2020; Taverniti and Guglielmetti, 2011). Les divergences d'efficacité des souches probiotiques actuellement étudiées, le maintien de leur viabilité le long du tractus digestif et le manque de connaissance quant à leur mode d'action permettent de considérer les parabiotiques comme une alternative d'étude des mécanismes d'interaction entre les bactéries et leur hôte.

Lorsque l'activité est conservée sous sa forme inactivée, l'usage de parabiotiques permet de s'affranchir des risques liés aux phénomènes de translocation de bactéries viables, mais aussi de limiter le développement de résistances aux antibiotiques, ou la modification du microbiote déjà présent (Piqué *et al.*, 2019). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence le caractère thermorésistant des composés actifs de souches probiotiques (Lee *et al.*, 2016) (**Figure 23**). C'est notamment le cas de *Lactobacillus casei* Lbs2 étudiée dans le traitement des MICI (Thakur *et al.*, 2016) mais aussi de VSL#3 (Sang *et al.*, 2013) exerçant des activités immunomodulatrices similaires qu'elles soient administrées vivantes ou inactivées. D'autres souches probiotiques sont concernées : au niveau de la muqueuse intestinale, *Lactobacillus paracasei* MCC1849 inactivée thermiquement conserve son activité bénéfique de défense contre l'infection de pathogènes en stimulant la production d'IgA (Arai *et al.*, 2018). C'est également le cas de *Bifidobacterium breve* M-16V qui maintient ses propriétés immunomodulatrices en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires, aussi bien sous sa forme viable qu'inactivée par la chaleur (Sugahara *et al.*, 2017). Enfin, parmi les probiotiques de nouvelle génération, l'espèce *A. muciniphila* est un très bon exemple de parabiotique en développement.



En effet, afin d'identifier le composé actif, celle-ci a été inactivée thermiquement et a démontré des activités accrues en réduisant la masse graisseuse et le développement de l'insulinorésistance chez des souris diabétiques et obèses (Plovier *et al.*, 2017). Ces études démontrent que, pour exercer certaines activités, les souches probiotiques ne doivent pas nécessairement être viables.

#### 2.4.5. *Les postbiotiques ou métabiotiques*

Les **postbiotiques**, aussi appelés **métabiotiques**, sont des mélanges complexes de métabolites bactériens, qu'ils soient sécrétés par la bactérie viable ou bien libérés lors de l'inactivation (thermique, physique ou chimique) bactérienne, et qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice sur la santé de l'hôte. Ces métabolites peuvent donc être le résultat du métabolisme bactérien comme des AGCC ou bien des composants de la bactérie tels que des protéines, des polysaccharides, des acides organiques, des LTA ou des peptidoglycanes (Mayorgas *et al.*, 2021). Tout comme les parabiotiques précédemment cités, les postbiotiques, en mimant les effets bénéfiques du probiotique, permettent de s'affranchir des risques et des contraintes liés à l'administration de bactéries viables (Tsilingiri *et al.*, 2012). En revanche, des étapes d'extraction ou de purification sont parfois nécessaires. Les postbiotiques exercent des activités très variées comme des effets antioxydants ou des effets de biopréservation (Cuevas-González *et al.*, 2020), des effets anti-inflammatoires, anti-tumoraux, antimicrobiens ou cicatrisants (Żółkiewicz *et al.*, 2020) permettant d'envisager leur utilisation en santé humaine dans des contextes pathologiques variés. Cependant, bien que les études réalisées sur les postbiotiques soient encourageantes, le niveau d'efficacité doit encore être évalué et le mode d'action doit être exploré. Cette phase de caractérisation est engagée pour certaines souches probiotiques de nouvelle génération ayant prouvé leurs propriétés bénéfiques. C'est notamment le cas des espèces *F. prausnitzii* et *A. muciniphila* pour lesquelles l'identification du ou des composés actifs représente un enjeu majeur dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques (Breyner *et al.* 2017; Depommier *et al.* 2019; Mulhall *et al.* 2020; Plovier *et al.* 2017; Quévrain *et al.* 2016b; Zhang *et al.* 2021).



### 3. Identification de probiotiques de nouvelle génération aux propriétés antalgiques pour le traitement des douleurs viscérales

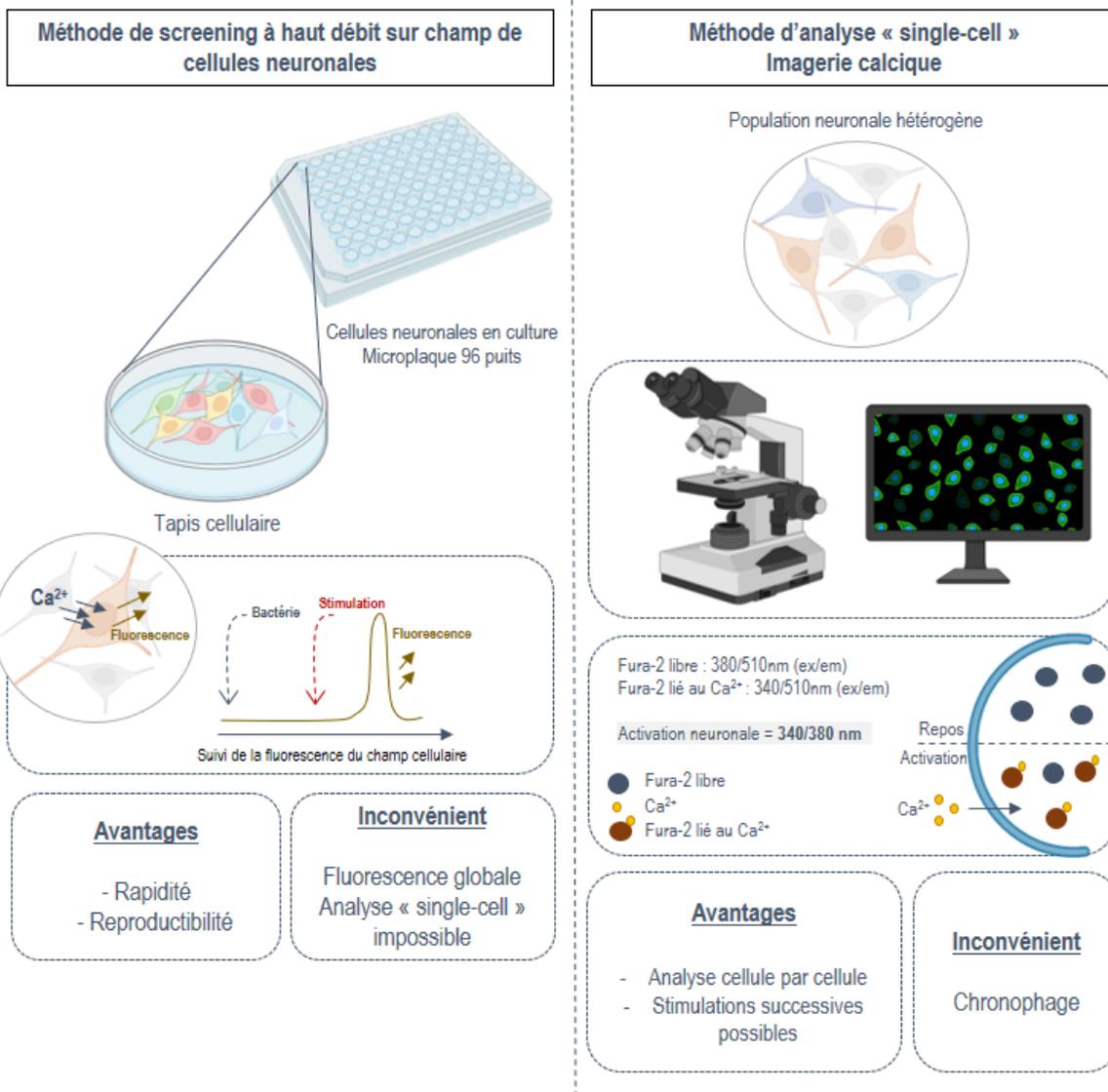
#### 3.1. Isolement et identification des candidats bactériens

Les progrès en matière de séquençage permettent aujourd'hui d'identifier des signatures microbiennes propres à certaines pathologies. Alors que certaines bactéries sont retrouvées plus abondantes, certains membres du microbiote intestinal voient leur population s'effondrer chez les malades, faisant d'elles des candidats potentiels dans le développement de probiotiques de nouvelle génération. Dans le cas des MICI par exemple, l'espèce bactérienne *F. prausnitzii* est systématiquement pointée du doigt et pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de MICI mais aussi de SII (Caenepeel *et al.*, 2020).

La plupart des souches d'intérêt dans le développement de LBP colonise le côlon, un environnement caractérisé par une anaérobiose stricte. Ces conditions extrêmes ne facilitent pas l'étape d'isolement de souches bactériennes du fait de leur extrême sensibilité à l'oxygène. Les techniques classiques d'isolement emploient généralement une chambre anaérobie ainsi que des milieux de culture enrichis en agents réducteurs. Cette étape d'isolement est très souvent longue et fastidieuse et ne permet pas d'accéder à toute la diversité microbienne colonisant le TGI (Martín *et al.*, 2017). Aujourd'hui, l'isolement de souches bactériennes coliques est facilitée par le développement de systèmes adaptés. En couplant une chambre anaérobie à un cytomètre en flux capable de trier les cellules selon différents paramètres (viabilité cellulaire, granulométrie, taille, reconnaissance par des anticorps spécifiques, propriétés de surfaces), la plateforme ANOXIC discrimine plusieurs populations bactériennes au sein de l'échantillon et permet de repiquer les bactéries d'intérêt tout en maintenant les propriétés strictement anaérobies du système. Ce système innovant est un outil prometteur pour l'étude du microbiote fécal et plus particulièrement pour les espèces sous-représentées (Bellais *et al.*, 2022).

#### 3.2. Évaluation des propriétés neuromodulatrices *in vitro*

Aujourd'hui, le développement d'une méthodologie permettant la sélection de candidats bactériens aux propriétés antalgiques serait un bon moyen d'accélérer le développement de souches thérapeutiques candidates. La démonstration de ces activités passe par des tests réalisés *in vitro*. Les propriétés bénéfiques de souches bactériennes pouvant conduire à un effet antalgique chez l'animal sont variées.



**Figure 24 : Évaluation du potentiel neuromodulateur de bactéries par 2 méthodes basées sur le suivi de flux calciques.** À gauche, les flux calciques reflétant l'activation des cellules neuronales sont suivis grâce à un lecteur de fluorescence équipé d'un système d'injection. Les cellules neuronales sont cultivées dans les puits d'une microplaque de 96 puits puis marquées avec une sonde calcique. Cette méthode permet de tester 96 conditions de façon simultanée. En revanche, le signal d'activation correspond au champ cellulaire total contenu dans le puit. De plus, ce système ne permet pas le lavage des puits entre chaque stimulation. À droite, les flux calciques sont suivis grâce à un microscope inversé équipé d'une caméra. Les cellules neuronales, préalablement marquées avec la sonde Fura-2, sont perfusées en continu avec les différentes solutions stimulatrices à tester. Un système d'aspiration permet de rincer les cellules entre chaque stimulation. Les cellules neuronales sont alternativement exposées à une longueur d'onde de 340 nm et 380 nm pendant 400 ms. Alors qu'à 380 nm, la sonde sous sa forme libre émet une fluorescence à 510 nm, à 340 nm, c'est la forme liée au calcium qui émet un signal à 510 nm. Le ratio de la fluorescence émise à ces 2 longueurs d'onde permet d'accéder à l'état d'activation de chacune des cellules neuronales présentes sur le champ d'acquisition.

Elles peuvent être indirectes en restaurant l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale par exemple (Mennigen *et al.*, 2009) ou en limitant la réaction inflammatoire. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux propriétés neuromodulatrices de souches bactériennes.

**Profil métabolique de souches bactériennes :** Comme évoqué précédemment dans ce manuscrit, certaines bactéries commensales intestinales sont capables de produire un large éventail de métabolites comme des neurotransmetteurs par exemple. Ces neurotransmetteurs interviennent dans le dialogue intestin-cerveau et participent à l'homéostasie intestinale mais aussi à la motilité intestinale et à la douleur viscérale (Kannan *et al.*, 2017). Le profil métabolique de souches microbiennes peut-être évalué par plusieurs méthodes comme le dosage de métabolites (HPLC ou métabolomique dirigée) ou bien par l'analyse de son génome (séquençage complet du génome). Le dosage de certaines molécules comme le GABA ou de l'activité enzymatique de la glutamate décarboxylase (GAD) par exemple est un moyen rapide d'évaluer le potentiel neuromodulateur de bactéries intestinales (Laroute *et al.*, 2022). C'est également le cas pour l'activité des protéases produites par certains membres du microbiote intestinal (Sessenwein *et al.*, 2017) ou bien de certains métabolites issus de la voie de dégradation du tryptophane tel que l'indole (Chung *et al.*, 2021). Ainsi, la capacité qu'ont certaines bactéries à produire des molécules modulant l'activation neuronale est un premier indice de leur potentiel neuromodulateur.

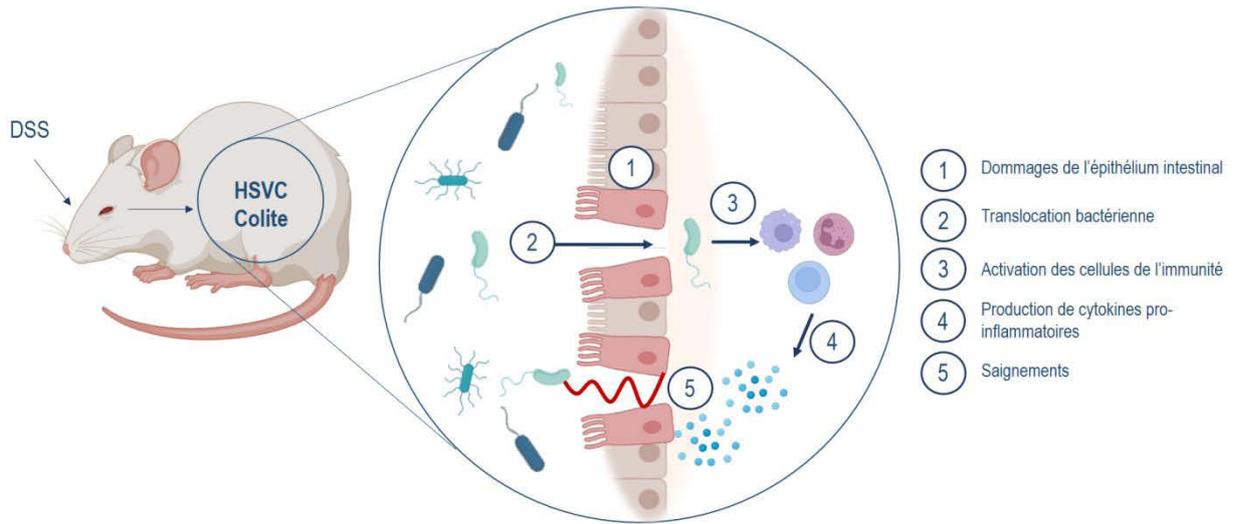
**Propriétés neuromodulatrices de souches bactériennes :** Les propriétés neuromodulatrices de souches bactériennes peuvent être évaluées, *in vitro*, par plusieurs méthodes. Le suivi des flux calciques ou sodiques est une technique qui renseigne de l'état d'activation de la cellule neuronale en se basant sur les flux ioniques. Cette technique utilise des sondes spécifiques permettant de suivre la concentration intracellulaire de calcium ou de sodium. Le suivi de flux calcique peut être réalisé à haut débit, à l'aide d'un lecteur de microplaque à fluorescence. Dans ce cas précis, l'acquisition du signal fluorescent renseigne de l'activation globale d'un champ de cellules. L'étude de l'activation neuronale à l'échelle de la cellule est néanmoins possible en utilisant la technique d'imagerie calcique. Bien qu'elle soit chronophage, cette technique permet d'évaluer avec précision le potentiel neuromodulateur de bactéries mais aussi d'explorer certains aspects mécanistiques et a déjà été utilisée dans plusieurs études afin d'explorer les interactions entre bactéries et neurones (Chiu *et al.*, 2013b; Perez-Burgos *et al.*, 2015; Ruhl *et al.*, 2020) (**Figure 24**).



Les propriétés neuromodulatrices de souches bactériennes peuvent également être étudiées grâce à des techniques d'électrophysiologie. Ces techniques permettent d'étudier les phénomènes électriques et électrochimiques de cellules ou de tissus, et plus particulièrement de cellules ou de fibres musculaires. Cette étude passe notamment par la mesure de différences de potentiels ou de courants électriques à différentes échelles biologiques. La mesure du potentiel de membrane, de la capacitance, et la détermination de la rhéobase, autrement dit, le courant électrique nécessaire à la génération d'un potentiel d'action permettent d'apprécier les propriétés membranaires et électrophysiologiques des neurones. Les techniques d'électrophysiologie ont d'ores et déjà été utilisées dans plusieurs études (Ma *et al.*, 2009; Perez-Burgos *et al.*, 2015).

### 3.3. Évaluation des propriétés antalgiques *in vivo* : utilisation de modèles animaux de douleur viscérale

Puisqu'il n'existe pas de modèle mimant avec exactitude la physiopathologie des MICI ou du SII, le développement de modèles animaux est une étape clé afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des symptômes observés et de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de ces pathologies encore mal comprises. En effet, la physiopathologie des MICI et du SII étant extrêmement complexe, les modèles animaux existants ne reproduisent que certains aspects de ces pathologies comme l'inflammation intestinale, la rupture de la barrière épithéliale ou encore la perturbation de l'axe intestin-cerveau mais ils se sont révélés très utiles dans cette démarche. Les modèles privilégiés dans ces travaux de recherche conduisent tous au développement d'une HSVC chez la souris dont l'origine peut être inflammatoire, post-inflammatoire, une perturbation de l'axe intestin-cerveau ou la conséquence d'une infection bactérienne. Dans ces modèles, il est possible de distinguer les modèles de MICI, induits par l'administration de DSS, de Dinitrobenzen sulfonic acid (DNBS) ou de TNBS, des modèles de SII-PI induits par l'infection par des pathogènes tels que *Citrobacter rodentium* ou *Trichinella spiralis* ainsi que des modèles induisant la perturbation de l'axe intestin-cerveau tel que le modèle de séparation maternelle (NMS). D'autres modèles d'inflammation à bas bruit ou de douleur post-inflammatoire permettent d'étudier et d'évaluer l'HSVC chez l'animal. C'est notamment le cas de l'acide acétique, du Zymosan et de l'huile de moutarde, des composants irritants qui, lorsqu'ils sont administrés par instillation rectale induisent une colite chez le rat ou chez la souris et semblent être adaptés à l'étude du SII (Burton and Gebhart, 1995; La *et al.*, 2003).



**Figure 25 : Représentation schématique du mode d'action du DSS sur un épithélium intestinal.** Inspiré de Chassaing *et al.*, (2014).

### 3.3.1. Modèle de douleur inflammatoire : Dextran Sulfate Sodium

Le dextran sulfate sodium ou DSS (36-50 kD) est un polysaccharide sulfaté capable d'induire une colite lorsqu'il est administré dans l'eau de boisson des animaux (Chassaing *et al.*, 2014; Okayasu *et al.*, 1990). La sévérité des symptômes associés à la colite dépend de la dose utilisée mais aussi de la durée du traitement et du fond génétique de l'animal. De manière générale, la dose de DSS utilisée varie de 0.5% à 5% et la durée du traitement peut aller jusqu'à 12 jours consécutifs. Le DSS est un composé cytotoxique entraînant la mort des entérocytes et une hausse de la perméabilité intestinale soutenue par une perturbation de l'expression des jonctions serrées (Poritz *et al.*, 2007). L'hyperperméabilité intestinale favorise la translocation bactérienne. Le passage de composés microbiens au travers de l'épithélium intestinal active les cellules de l'immunité sous-jacentes et stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Yan *et al.*, 2009). L'effet du DSS se traduit, chez l'animal, par une perte de poids significative et une diarrhée parfois sanglante. Au niveau macroscopique, l'inflammation, l'infiltration de cellules immunitaires ainsi que l'augmentation du renouvellement cellulaire entraînent un épaississement de la paroi colique (**Figure 25**).

Enfin, ce modèle est caractérisé par une perte de l'équilibre du microbiote intestinal. Bien que les mécanismes ne soient pas encore totalement élucidés, cette dysbiose contribuerait largement au développement et au maintien de l'HSVC observée dans ce modèle en phase post-inflammatoire (Esquerre *et al.*, 2020). En effet, après résolution de l'inflammation, le microbiote intestinal pourrait sensibiliser les nocicepteurs et contribuer au maintien de l'hyperalgie chez ces animaux.

### 3.3.2. Modèle de douleur post-inflammatoire : DNBS et TNBS

Dans ce modèle, la douleur viscérale est induite par instillation rectale de DNBS, ou de TNBS. L'administration de ces composés, repris dans une solution d'éthanol (30% (v/v)), induit une colite chez la souris ou chez le rat. L'éthanol a pour effet d'altérer l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale augmentant ainsi la perméabilité intestinale tandis que le DNBS ou le TNBS, qui sont des haptènes, modifient les antigènes du soi reconnus comme du non-soi par les cellules de l'immunité et provoquant alors une réaction inflammatoire forte dès la première instillation. Enfin, les espèces oxygénées réactives (ROS) et les médiateurs inflammatoires tels que la prostaglandine E2 et les interleukines participent au développement d'une diarrhée marquée (Grisham *et al.*, 1991), induisant une déshydratation forte et une perte de poids chez les animaux.



Les animaux développent une HSVC (Gschossmann *et al.*, 2004) plus ou moins marquée selon la dose administrée (Adam *et al.*, 2006). L'effet du DNBS est transitoire puisque l'inflammation et la diarrhée provoquées s'atténuent quelques jours seulement après l'instillation rectale. L'HSVC est quant à elle durable puisqu'elle est toujours présente 4 jours après l'instillation (Lucarini *et al.*, 2021). La persistance de l'HSVC après l'épisode inflammatoire est un phénomène qui est aussi observé chez le rat. En effet, dans un modèle de colite induite chimiquement au TNBS, l'HSVC semble persister à distance du site et du moment d'injection du composé suggérant que l'épisode inflammatoire sensibilise les afférences coliques plus éloignées (Diop *et al.*, 2002). Enfin, dans une étude récente, le rôle du microbiote intestinal dans les douleurs post-inflammatoires a été démontré. Certains métabolites microbiens pourraient notamment être à l'origine de l'HSVC persistante malgré l'absence d'inflammation chez ces animaux (Esquerre *et al.*, 2020).

### 3.3.3. Modèle de stress par séparation maternelle : NMS

Des études ont montré qu'un stress de séparation maternelle subit pendant l'enfance pouvait engendrer un traumatisme, avoir des répercussions émotionnelles à long terme et prédisposer au développement de pathologies à l'âge adulte (Champagne *et al.*, 2003; Cirulli *et al.*, 2003). Le modèle de stress induit par la séparation maternelle a été reproduit chez la souris. Dans ce modèle, les souris sont séparées de leur mère, 3h par jour pendant 12 jours dès le deuxième jour suivant la naissance. Cette séparation quotidienne provoque de l'anxiété chez la mère entraînant une perturbation des soins maternels prodigués à sa progéniture, altérant ainsi la relation mère-petit. Cette séparation est vécue comme un traumatisme favorisant le développement d'une anxiété *via* l'activation de l'axe HHC impliqué dans la réponse au stress (O'Mahony *et al.*, 2011b) mais aussi une altération des fonctions cognitives et émotionnelles. Une perturbation de l'axe corticotrope a aussi été décrite et se traduit par (i) une hausse du niveau basal de corticostérone (McCormick *et al.*, 1998) mais aussi par (ii) une hausse de la perméabilité intestinale (Moussaoui *et al.*, 2017), par (iii) le développement d'une HSVC chez 50% des animaux à l'âge adulte (Riba *et al.*, 2017) et par (iv) une dysbiose du microbiote intestinal (Moussaoui *et al.*, 2017; Riba *et al.*, 2017). Cette dysbiose se caractérise par une baisse de la diversité microbienne, mais aussi des bactéries productrices de butyrate (Moussaoui *et al.*, 2017), par une augmentation de l'abondance relative de la famille bactérienne S24-7 et une diminution de l'abondance relative des genres *Bacteroides* et *Allobaculum* (Riba *et al.*, 2017). Quant à l'HSVC, l'implication du canal TRPV1 a été suggérée dans ce modèle (van den Wijngaard *et al.*, 2009).



Ainsi, la séparation survenant pendant une période de développement cruciale nuit à la maturation appropriée des systèmes modulateurs essentiels. Ce stress survenant au début de la vie entraîne une série d'altérations dans l'axe intestin-cerveau qui sont influencées par le sexe, la génétique, le stress et le moment de l'intervention (O'Mahony *et al.*, 2011).

#### 3.3.4. Modèle post-infectieux

Aujourd'hui il est admis qu'environ un patient sur dix développe un SII suite à une infection bactérienne à *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella* ou *Shigella* (Qin *et al.*, 2011; Spiller and Garsed, 2009). Une infection virale ou parasitaire peut également être à l'origine du développement d'un SII (Spiller and Garsed, 2009). À l'heure actuelle, plusieurs modèles animaux utilisant des organismes pathogènes sont utilisés pour mimer le SII-PI. Ces modèles sont très utiles pour l'étude de la physiopathologie du SII-PI puisqu'ils induisent la plupart des symptômes observés chez les patients. Parmi eux, la perturbation de la motilité intestinale, l'activation d'une réponse inflammatoire, les dommages causés à la barrière épithéliale intestinale ou le développement de douleurs viscérales ont été décrits (Barbara *et al.*, 2019). Les organismes pathogènes utilisés peuvent être parasitaires comme *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Cryptosporidium parvum* ou *Giardia duodenalis* ou bactériens comme *Campylobacter jejuni* et *C. rodentium*. Chacun de ces modèles murins présente ses avantages et ses inconvénients. Seuls les modèles d'infection à *Citrobacter rodentium* et *Trichinella spiralis* seront présentés dans ce manuscrit.

##### 3.3.4.1. *Citrobacter rodentium*

*C. rodentium* est une bactérie Gram négative, appartenant à la famille des entérobactéries, et utilisant les lésions de type attachement/effacement pour coloniser la muqueuse colique chez les rongeurs. L'infection à *C. rodentium* s'apparente à celle d'*E. coli* entéropathogène survenant chez l'Homme. Dans ce modèle, les souris sont infectées par la bactérie pathogène *C. rodentium*. Au cours de sa colonisation, le pathogène s'attache aux cellules épithéliales intestinales et, en remodelant localement le cytosquelette d'actine, va entraîner un effacement de la bordure en brosse de l'entérocyte auquel elle est attachée. L'infection démarre après l'administration de  $10^8$  à  $10^9$  UFC/souris par gavage oral. Suite à l'infection, les souris sont rapidement colonisées et atteignent le pic de l'infection au 7<sup>ème</sup> jour après l'infection puis la charge bactérienne diminue jusqu'à la clairance totale du pathogène au 16<sup>ème</sup> jour post-infection.



L'infection à *C. rodentium* est un modèle de référence dans l'étude de pathologies intestinales telles que les MICI dans lequel le développement d'une colite, l'infiltration de cellules neutrophiles, la rupture de la barrière épithéliale intestinale et l'implication de cytokines pro-inflammatoires ont été décrites (pendant la phase infectieuse) (Mullineaux-Sanders *et al.*, 2019) mais est aussi et surtout un excellent modèle animal pour l'étude du SII-PI (Meynier *et al.*, 2022). En effet, en plus de développer une HSVC, ce modèle permet d'étudier la composante comportementale et les comorbidités associées. En phase post-infectieuse, lorsque le pathogène a été totalement éliminé, les souris développent une HSVC associée à un comportement de type anxieux pouvant s'apparenter au SII-PI chez l'Homme, faisant suite, la plupart du temps à une infection gastro-intestinale (Meynier *et al.*, 2022).

#### 3.3.4.2. *Trichinella spiralis*

*T. spiralis* est un nématode parasite colonisant le tractus digestif des rats et des souris et induisant la plupart des symptômes retrouvés chez les patients atteints de SII-PI comme une forte inflammation, une perturbation de la motilité intestinale, une hausse de la perméabilité intestinale et le développement d'une HSVC. Bien que ce modèle réunisse l'ensemble des aspects physiopathologiques du SII-PI, le possible passage des larves dans la circulation sanguine et dans le cerveau représente une limite (Barbara *et al.*, 2019). L'implication du microbiote dans le développement de l'HSVC en phase post-infectieuse est largement suggérée. En effet, la transplantation de microbiote fécal sain ou l'administration de *B. longum* a permis d'augmenter le seuil de sensibilité à la DCR chez le rat en phase post-infectieuse. Cet effet pourrait notamment être le résultat de la restauration de l'intégrité de la barrière épithéliale par le microbiote (Bai *et al.*, 2018).

### 4. Les candidats bactériens dans le traitement de la douleur viscérale

En plus de constituer des biomarqueurs de la pathologie, les signatures microbiennes ont permis d'identifier plusieurs candidats bactériens dans le traitement de pathologies intestinales (Baumgart *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2007; Miquel *et al.*, 2013; Rajilić–Stojanović *et al.*, 2011; Sokol *et al.*, 2006). Les propriétés portées par ces souches bactériennes sont, la plupart du temps, des effets anti-inflammatoires ou de restauration de la barrière épithéliale intestinale. Afin de traiter plus spécifiquement les douleurs abdominales chez les patients atteints de MICI ou de SII, d'autres activités telles que la régulation du transit intestinal ou des effets antalgiques sont actuellement recherchées.



#### 4.1. Les probiotiques régulateurs du transit intestinal

L'idée qu'une interaction directe entre le microbiote intestinal et le SNE puisse moduler la motilité intestinale est une piste récemment explorée dans la recherche de nouvelles solutions thérapeutiques. Dans cette optique, plusieurs souches probiotiques ont été étudiées pour leurs effets sur la motilité intestinale. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, récemment renommée *Limosilactobacillus reuteri*, fait l'objet d'un grand nombre d'études et a déjà prouvé son efficacité dans le traitement de ces troubles digestifs (Saviano *et al.*, 2021). *L. reuteri* est capable d'interagir avec le SNE en modulant l'activité de neurones coliques et en modulant le péristaltisme chez le rat (Wang *et al.*, 2010). Bien que le mécanisme soit encore peu décrit, la modulation du péristaltisme par la souche *L. reuteri* DSM 17938 pourrait passer par la sécrétion de microvésicules puisque l'application de ces composés est nécessaire et suffisante pour reproduire l'effet neuromodulateur de la souche bactérienne ce qui suggère qu'ils constituent l'élément actif (West *et al.*, 2020). En interagissant avec le récepteur FPR1, la souche probiotique *Lactobacillus rhamnosus* LGG est quant à elle, capable de stimuler la motilité intestinale. Dans cette étude, un mécanisme d'action impliquant la reconnaissance de *L. rhamnosus* GG *via* les récepteurs FPR1 a été proposé. Cette reconnaissance provoque l'augmentation de la production de ROS par les neurones myentériques, l'activation de la voie ERK/MAPK stimulant ainsi la contraction péristaltique (Chandrasekharan *et al.*, 2019).

D'autres souches probiotiques ont prouvé leurs effets bénéfiques en modulant le transit intestinal. C'est notamment le cas de *L. casei* et de *Bifidobacterium lactis* (HN019 et Bf-6) (Dimidi *et al.*, 2017). Chez l'Homme, l'administration d'un cocktail de souches probiotiques (*Lactobacillus sp.* et *Bifidobacterium sp.*) pendant 8 semaines a permis d'améliorer le transit chez des patients atteints de la maladie de Parkinson et souffrant de constipation (Ibrahim *et al.*, 2020), un symptôme partagé par 80 à 90% des patients atteints de cette pathologie. La souche probiotique *E. coli* Nissle 1917 (commercialisée sous le nom de Mutaflor®) a quant à elle montré un effet bénéfique en ralentissant le transit intestinal. Elle est notamment prescrite dans le traitement de la diarrhée du voyageur. En agissant sur le SNE intrinsèque, *E. coli* Nissle 1917 limite la fréquence et l'intensité des contractions intestinales et coliques et contrôle ainsi le péristaltisme (E. Dalziel *et al.*, 2015). À l'inverse, l'activité promotrice de la souche *Bifidobacterium lactis* HN019 sur le péristaltisme a été démontrée chez le rat (Dalziel *et al.*, 2017). Bien que le potentiel neuromodulateur du microbiote suscite un intérêt accru ces dernières années, les mécanismes d'interaction sont encore mal connus. De plus, les activités sont parfois contraires chez des espèces bactériennes pourtant très proches.



C'est par exemple le cas de *L. rhamnosus* JB-1 et de *L. reuteri* 17938 qui, appliquées vivantes sur un côlon de souris, déclenchent des activités différentes. Alors que *L. rhamnosus* JB-1 réduit le péristaltisme, *L. reuteri* 17938 l'augmente (Wu *et al.*, 2013). Ainsi, en plus de représenter une stratégie séduisante dans le traitement des troubles gastro-intestinaux tels que la constipation ou les diarrhées, la recherche de bactéries inhibant le péristaltisme pourrait constituer une piste intéressante afin de limiter les contractions abdominales et la douleur ressentie chez les patients.

## 4.2. Les probiotiques aux propriétés antalgiques

### 4.2.1. Les probiotiques conventionnels aux propriétés antalgiques

Plusieurs souches probiotiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont démontré leurs activités bénéfiques en restaurant la barrière épithéliale intestinale ou en exerçant des propriétés anti-inflammatoires. Certaines d'entre-elles auraient des propriétés antalgiques en réduisant les douleurs viscérales. C'est le cas de la souche *Bifidobacterium infantis* 35624 exerçant une activité anti-nociceptive en augmentant le seuil de tolérance à la DCR chez le rat (Mckernan *et al.*, 2010). La souche *Lactobacillus paracasei*, récemment renommée *Lacticaseibacillus paracasei*, a quant à elle permis d'atténuer l'hypersensibilité viscérale de souris ayant reçu un traitement antibiotique (Verdú *et al.*, 2006). Chez l'animal, l'administration d'un cocktail de souches probiotiques (VSL#3) a permis de réduire l'HSVC induite par l'administration d'acide acétique. Cet effet passerait notamment par des récepteurs impliqués dans la sensibilité viscérale tels que TRPV1 et PAR2 (Li *et al.*, 2019). Chez l'Homme, VSL#3 a lui aussi démontré son efficacité chez des patients âgés de 4 à 18 ans atteints de SII (Guandalini *et al.*, 2010).

En modulant l'expression de gènes neuronaux, en régulant la production de corticostérone et en modifiant le microbiote, la souche *L. rhamnosus* GG a permis de réduire le niveau de sensibilité colique de souris dans un modèle NMS. Bien que le composé actif n'ait pas été identifié, il semblerait que ces activités bénéfiques soient portées par des éléments sécrétés par la bactérie lors de sa culture (McVey Neufeld *et al.*, 2020).

*Lactobacillus reuteri* (DSM17938) fait elle aussi partie des souches probiotiques d'intérêt dans le traitement de la douleur viscérale. Dans une étude, cette souche probiotique a montré des effets très intéressants sur l'activation neuronale de nocicepteurs issus de DRG exprimant le canal TRPV1, fortement impliqué dans la douleur.



Bien que le composé actif ne soit pas encore connu, les propriétés neuromodulatrices pourraient être à l'origine de l'effet antalgique de la souche, observé chez le rat (Perez-Burgos *et al.*, 2015).

*E. coli* Nissle 1917, est quant à elle capable de produire un lipopeptide C12AsnGABAOH aux propriétés antalgiques. Ce composé peut passer la barrière épithéliale et activer les récepteurs GABA<sub>B</sub> (Pérez-Berezo *et al.*, 2017) conduisant à une hyperpolarisation des cellules neuronales et à une baisse du seuil de sensibilisation.

Certaines souches bactériennes sont reconnues pour leur capacité à convertir le glutamate en GABA et pourraient représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement des douleurs abdominales chroniques. C'est notamment le cas de la souche bactérienne *L. lactis* NCDO2118 qui, en produisant du GABA au niveau intestinal, est capable de réduire l'HSVC dans un modèle de stress chez le rat (Laroute *et al.*, 2022). En produisant du GABA et en désensibilisant des afférences nociceptives coliques, la souche *B. dentium* ATCC 27678 présente elle aussi un effet bénéfique en réduisant l'HSVC chez le rat (Pokusaeva *et al.*, 2017b).

#### 4.2.2. Les probiotiques de nouvelle génération aux propriétés antalgiques

Aujourd'hui, plusieurs candidats bactériens font l'objet d'études approfondies et se destinent à entrer dans cette nouvelle classe de médicaments : les **LBPs**. Pour certains d'entre-eux, une meilleure caractérisation des mécanismes d'interaction a permis d'identifier les substances bactériennes actives.

***Akkermansia muciniphila*** : L'espèce *A. muciniphila* est l'une des bactéries les plus abondantes du microbiote intestinal. Associée à la muqueuse digestive, sa population est largement réduite chez les patients souffrant du syndrome métabolique mais aussi chez de jeunes patients atteints de la MC (Lopez-Siles *et al.*, 2018). Cette bactérie particulière est capable d'interagir avec le récepteur TLR2. Cette interaction passe par la protéine Amuc\_1100, constitutive des pili de la bactérie (Ottman *et al.*, 2017b; Plovier and Cani, 2017). Les capacités immunomodulatrices de cette espèce bactérienne sont très étudiées à l'heure actuelle et celle-ci est rapidement devenue une souche candidate dans le traitement du syndrome métabolique en lien avec l'obésité, le diabète, et les pathologies cardiovasculaires ou les MICI, pathologies dans lesquelles l'intégrité intestinale est compromise (Ansaldo *et al.*, 2019; Cani and de Vos, 2017).



Les recherches accrues menées sur *A. muciniphila* révèlent que cette espèce bactérienne recèle d'effets bénéfiques puisqu'elle serait aussi impliquée dans le processus de modulation de la douleur viscérale. En effet, l'abondance d'*A. muciniphila* a été inversement corrélée aux douleurs abdominales chez des patients atteints de SII et ayant subi une TMF (Cruz-Aguliar *et al.*, 2019).

***Clostridium butyricum*** : En réduisant la réponse inflammatoire induite chimiquement par le TNBS chez la souris, l'espèce *C. butyricum* exerce elle aussi un effet bénéfique en modulant la réponse inflammatoire à proximité de la muqueuse intestinale. En effet, la souche *C. butyricum* administrée pendant 7 jours et ceci 4 semaines après le traitement au TNBS, permet de réduire significativement le niveau d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 et l'HSVC à la DCR (Zhao *et al.*, 2019). En modulant la réponse inflammatoire, *C. butyricum* exerce un effet anti-nociceptif en rétablissant le niveau d'expression du récepteur NLRP6, retrouvé sous-exprimé chez les patients atteints de SII (Zhao *et al.*, 2018).

***Faecalibacterium prausnitzii*** : Les nombreuses études menées sur cette espèce bactérienne confirment aujourd'hui, qu'en plus d'avoir des propriétés anti-inflammatoires liées à sa production de butyrate, *F. prausnitzii* exerce un potentiel bénéfique pour le bien-être et la santé humaine. En effet, *F. prausnitzii* pourrait présenter des propriétés antalgiques, venant s'ajouter à ses propriétés anti-inflammatoires notamment en réduisant l'HSVC comme cela a été démontré chez des souris dans un modèle murin de SII induit par NMS (Miquel *et al.*, 2016). La protéine microbienne anti-inflammatoire (MAM, Microbial Anti-Inflammatory Molecule), découverte dans son surnageant de culture est capable d'inhiber la voie NF- $\kappa$ B dans plusieurs lignées cellulaires intestinales (Quévrain *et al.*, 2016a) et une interaction directe entre la bactérie et les cellules neuronales n'est pas exclue. Cette souche suscite un intérêt croissant auprès des chercheurs puisque certains phylotypes produisent une matrice d'exopolysaccharides membranaires (EPM) aux effets immunomodulateurs, passant par la voie TLR2 et conduisant à la libération de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IL-10 (Rossi *et al.*, 2015).

***Parabacteroides distasonis*** : Certaines souches appartenant à l'espèce *P. distasonis* présentes au sein du microbiote intestinal, ont également montré des effets immunomodulateurs et protecteurs intéressants en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires et en stabilisant le microbiote intestinal (Kverka *et al.*, 2011). De plus, cette espèce bactérienne pourrait être positivement corrélée à la baisse de l'HSVC chez les souris ayant subi une séparation maternelle (McVey Neufeld *et al.*, 2020).



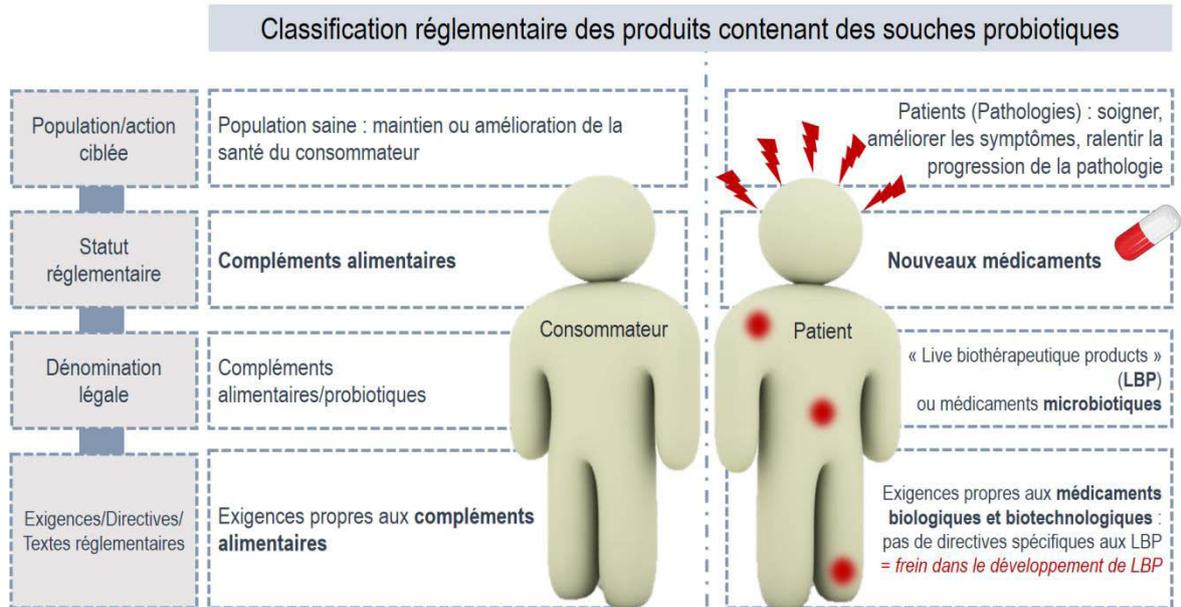
Les effets bénéfiques relatifs à cette espèce bactérienne sont néanmoins contradictoires et des études complémentaires sont nécessaires afin d'envisager son application dans le traitement de la douleur viscérale.

***Roseburia intestinalis*** : L'espèce *R. intestinalis*, représentante majoritaire du microbiote intestinal, dont les effectifs s'effondrent chez les patients atteints de MICI, a également prouvé son activité bénéfique. En effet, elle exerce des propriétés anti-inflammatoires en réduisant la production d'IL-17 (cytokine pro-inflammatoire) et est la principale espèce bactérienne productrice de butyrate au voisinage de l'épithélium intestinal ce qui fait d'elle une souche probiotique candidate dans la prévention ou le traitement des MICI (Zhu *et al.*, 2018).

Cette liste est non exhaustive et l'intensification des recherches dans ce domaine révèle l'existence de nouvelles souches probiotiques candidates dans le traitement de pathologies intestinales et plus particulièrement dans le traitement de douleurs abdominales chroniques. Certaines souches bactériennes font actuellement l'objet d'études cliniques et sont en lice pour l'obtention du statut de médicament. C'est notamment le cas de *A. muciniphila* préconisée dans le traitement du syndrome métabolique mais aussi dans le SII ou de *Blautia hydrogenotrophica* également préconisée dans un contexte de SII (clinicaltrials.gov).

## **5. Limites réglementaires liées à l'utilisation des probiotiques de nouvelle génération en santé humaine**

La définition des probiotiques donnée par l'organisation mondiale de la santé (FAO-OMS octobre 2001) s'applique à plusieurs types de produits finis tels que les aliments, les compléments alimentaires ou encore les médicaments. Les probiotiques ne constituent en aucun cas une catégorie de produits. Ils sont plutôt considérés comme des **substances** au même titre que les **principes actifs**. Ainsi, il est plus juste de dire d'un produit qu'il contient une substance probiotique. Les souches probiotiques sont donc des substances biologiques actives, exerçant des activités diverses (physiologique, immunologique, microbiologique, neurologique ou endocrinologique) en interagissant avec leur hôte. Le résultat de ces interactions peut représenter un avantage d'ordre nutritionnel ou bien thérapeutique (Cordaillat-Simmons *et al.*, 2022). Cependant, la définition proposée par la FAO-OMS ne présume pas du type de bénéfice apporté à l'hôte. Dire que le cadre réglementaire entre ces différents types de produits n'est pas bien défini est une idée reçue puisqu'il existe à l'heure actuelle un cadre réglementaire établi et définissant les conditions d'accès au marché pour chaque type de statut réglementaire.



**Figure 26 : Classification réglementaire des produits contenant des substances probiotiques.** Le terme et la réglementation auquel un produit contenant des microorganismes vivants est soumis dépend de son usage (population et action ciblées).

## 5.1. Définition du statut réglementaire d'un produit

Définir le statut réglementaire d'un produit permet d'identifier le cadre législatif et réglementaire à respecter et de suivre les lignes directrices ou les recommandations appropriées. Le statut réglementaire d'un produit est défini, non pas selon la nature du produit, mais selon son usage (aussi appelé « **Intended use** ») et selon la population ciblée (aussi appelée « **Intended population** »). Ainsi, la définition du statut réglementaire d'un produit nécessite de se poser les questions suivantes : quel est l'objectif / l'action du produit ? À quelle population s'adresse-t-il ? (Cordaillat-Simmons *et al.*, 2022). En effet, alors qu'un complément alimentaire aura pour effet d'améliorer ou de maintenir la bonne santé du consommateur, le médicament aura pour action de soigner, de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions physiologiques chez un patient malade ou bien chez une population à haut risque, autrement dit dont la susceptibilité de développer la pathologie est accrue (**Figure 26**). Bien qu'ils contiennent tous deux des souches probiotiques, ces deux catégories de produits ne sont pas soumises aux mêmes législations. Cette étape est primordiale et fait partie intégrante du développement d'un nouveau produit puisque les standards et les contraintes associées aux développements et à l'accès au marché seront bien différentes en fonction du statut réglementaire de ce produit.

### 5.1.1. Les compléments alimentaires

Les souches probiotiques sont retrouvées dans plusieurs catégories de produits. La plupart d'entre eux sont notamment représentés dans la classe des compléments alimentaires. Les compléments alimentaires se définissent comme des « denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés... » (d'après la Directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002). Lorsque les souches probiotiques sont des principes actifs de compléments alimentaires, ils doivent obtenir la certification de présomption d'innocuité reconnue (QPS, « Qualified Presumption of Safety ») accordée par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, « European Food Safety Authority ») ou le statut de généralement reconnu comme sans danger (GRAS, « Generally Recognized As Safe ») selon la réglementation américaine, délivrée par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA, « Food Drug Administration »).

**Tableau 4 : Feuille de route pour l'analyse des risques liés au développement des LBP.** Différents types de risques sont à prendre en compte dans le développement de LBP et sont à documenter aux étapes non cliniques et cliniques. Inspiré de Rouanet *et al.*, (2020).

<b>Risques relatifs au produit</b>	
<b>Étapes du développement</b>	
Risques liés à l'isolement et sélection de la souche microbienne	Origine, isolement, processus de sélection, manipulation de la souche avant sa mise en collection
Risques liés aux caractéristiques intrinsèques de la souche microbienne	Profil d'antibiorésistance, capacité de transfert de gène de résistance, profil de facteurs de virulence, translocation etc...
Risques liés au processus de production de la souche microbienne	Contaminations, optimisation du milieu de culture
Risques liés au produit fini	Formulation, mode d'administration, procédure médicale
<b>Risques relatifs au patient ciblé</b>	
Risques liés à l'administration du produit sous sa forme viable	Cible, mode d'action, dose, formulation, mode d'administration, physiopathologie, caractéristiques du patient etc...

L'évaluation du risque est une étape clé dans le développement d'un produit et dépend de son statut réglementaire. Dans le cas des compléments alimentaires, le bénéfice est considéré comme « nul » puisque le produit est testé sur une population saine. En revanche, le risque est bien évalué et prend en considération un point important : la consommation du produit en totale autonomie. Autrement dit, le consommateur est susceptible de consommer une dose supérieure à la dose préconisée. Dans ce contexte, la législation exige d'évaluer le risque et les effets indésirables liés à la consommation de 200 fois la quantité préconisée. De plus, un complément alimentaire, bien qu'il contienne des souches probiotiques, ne peut être préconisé dans le traitement de pathologies. Les tests ont été réalisés sur une population saine et les effets des compléments alimentaires contenant des souches probiotiques sur des patients atteints de pathologies est totalement inconnu et pourraient même avoir des conséquences désastreuses.

### 5.1.2. *Les nouveaux médicaments*

Les souches probiotiques pourraient être amenées à être représentées dans la catégorie des principes actifs de nouveaux médicaments. En effet, lorsque la souche probiotique a pour objectif de soigner une pathologie, celui-ci est soumis aux législations propres aux nouveaux médicaments. Dans ce contexte, le terme historique désignant ces produits est celui de « **Pharmabiotics** » mais la dénomination légale est « **Live Biotherapeutic Microorganisms** » (ou LBM) pour la substance active ou **Live Biotherapeutic Product** (LBP) pour le produit fini. Pour commercialiser un produit pharmaceutique, l'obtention d'une AMM est une étape obligatoire. En effet, les règles sont beaucoup plus strictes que celles appliquées aux compléments alimentaires du fait du niveau de risque jugé plus élevé. L'identification des risques liés au développement de LBP est une étape critique et complexe puisque les risques sont multiples. Ils peuvent être directement associés au LBP et concerner les étapes d'isolement, les caractéristiques de la souche microbienne, le procédé de fabrication ou bien le produit final. L'identification des risques concerne également le patient auquel le LBP est destiné (mode d'action, cible, dosage, formulation, pathophysiologie...) (Rouanet *et al.*, 2020) (**Tableau 4**).

Pour obtenir une AMM, le LBP doit répondre à plusieurs critères afin d'assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité du produit. La qualité repose notamment sur la reproductibilité du processus de fabrication, la conformité du produit (en définissant les points critiques et les standards définis en amont). Une caractérisation complète du produit développé, de la/les souche(s) microbienne(s) qu'il contient doit être fournie.



Cette caractérisation passe notamment par une exploration de son génome visant à rechercher d'éventuels gènes de virulence, de toxines ou encore de résistances aux antibiotiques, mais aussi de sa capacité à transférer des gènes (Dreher-Lesnick *et al.*, 2017). De plus, la fabrication du produit doit répondre à la certification des bonnes pratiques de fabrication des médicaments (GMP, « **Good manufacturing practices** ») délivrée par un organisme après un audit au sein de la société en charge de la production. La sécurité du produit ne peut mentionner les statuts GRAS ou QPS qui n'ont une valeur que dans la catégorie des compléments alimentaires puisque les tests sont réalisés sur une population saine. Le produit doit donc être évalué sur une population malade identifiée en amont pour juger de son innocuité. Il en va de même pour l'évaluation de l'efficacité du produit qui doit faire l'objet d'études précliniques, cliniques, en aveugle (*versus* placebo), réalisées par des organismes indépendants. Dans ces études, la production doit suivre un cahier des charges précis et préalablement défini. Une fois produit, le LBP doit être testé sur une population ciblée. Cette phase représente certainement l'étape la plus critique puisque les variabilités dans la composition du microbiote intestinal peuvent affecter son efficacité.

Aujourd'hui, quelques LBP bénéficient d'une AMM en France. Il y a par exemple Lénia® ou Trophigil® tous deux formulés à partir de la souche *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35, préconisés respectivement pour le traitement de diarrhée et pour le traitement des symptômes liés à l'atrophie vaginale. L'Ultra-levure® est quant à elle formulée à partir de la souche *Saccharomyces boulardii* et a été commercialisée pour la première fois en 1961. Cette préparation est préconisée dans le cadre du traitement de la diarrhée et dans la restauration de la microflore intestinale. Alors que *S. boulardii* peut être consommée en tant que complément alimentaire, elle a aussi démontré son efficacité sur une population très ciblée en traitant la diarrhée du voyageur. Ceci démontre qu'une souche probiotique peut bénéficier de deux statuts réglementaires : complément alimentaire et médicament. Ces produits sont relativement anciens et il n'existe pas à l'heure actuelle de nouveaux LBPs. Enfin, Mutaflor®, formulé à partir de *E. coli* Nissle 1917, n'est pas commercialisée en France mais possède le statut de médicament en Suisse dans l'indication « rectocolite hémorragique dans la phase de rémission ».

## 5.2. Limites réglementaires représentées par les LBPs

Actuellement, 2 grands types de produits pharmaceutiques existent : les médicaments « entités chimiques » et les médicaments biologiques et technologiques.



Parmi les médicaments biologiques et technologiques on distingue 3 sous-catégories que sont : les vaccins, les médicaments de thérapie innovante et les dérivés du sang et du plasma. La législation européenne ne définit donc pas de statut spécifique pour les LBP. Les industriels doivent donc s'appuyer sur les directives des produits biologiques et biotechnologiques n'incluant pas les LBP et dont les lignes directrices ne sont pas toujours adaptées à ce type d'innovation ce qui représente un frein dans le développement de cette nouvelle classe de médicaments biologiques (Cordaillat-Simmons *et al.*, 2020). Bien que la situation semble compliquée en Europe, elle n'est pas pour autant figée et sera amenée à évoluer dans les prochaines années. Les Etats-Unis en sont un bon exemple puisque plusieurs souches bactériennes intestinales font d'ores et déjà l'objet d'études cliniques pour une future application en tant que nouveau médicament. C'est notamment le cas de *Lactobacillus reuteri* IBP94-14 (ClinicalTrials.gov NCT03978000) préconisée pour le traitement de la colite ou encore *Christensenella minuta* (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT04663139) dans le traitement du syndrome métabolique lié à l'obésité chez l'Homme.

### 5.3. Évolution de la réglementation

Il n'existe pas à l'heure actuelle, de réglementation propre aux LBP au sein de l'Union Européenne. Néanmoins, il n'est pas juste de dire que la réglementation des LBP est floue puisqu'il n'y a pas d'incertitudes sur les cadres réglementaires mais simplement des questions réglementaires propres au développement de produits pharmaceutiques innovants. Ce qui peut paraître vague, c'est de savoir comment notre innovation peut répondre à la réglementation appliquée à tous les types de produits afin d'accéder au marché. Les cadres réglementaires ne sont pas définis sur la nature des produits afin de laisser la place à l'**innovation**.

Les LBP ne répondent pas aux directives fournies par la réglementation actuelle. L'évolution du cadre réglementaire est donc nécessaire de façon à répondre à ces innovations. Cette évolution doit être initiée par les scientifiques en collaboration avec les autorités réglementaires, en proposant des alternatives aux règles déjà existantes, en apportant la preuve de leur pertinence. La contextualisation est donc nécessaire et indispensable afin d'assurer l'avenir de l'innovation. Cette démarche est déjà initiée en France par le « **Pharmabiotics Research Institute** » (PRI) dans le cadre de leurs activités de « **Regulatory science** », véritable passerelle entre les chercheurs et les autorités réglementaires.



Le PRI est une association très engagée dans l'identification et la clarification des défis réglementaires et scientifiques rencontrés par les entreprises développant des LBPs et autres types de médicaments biologiques issus de la science du microbiome. En accompagnant les industries et les entités académiques dans le design d'études appropriées, le PRI intègre les cadres réglementaires dans un contexte d'innovation. Enfin, une bonne connaissance des similitudes et des divergences réglementaires observées entre différents territoires comme les États-Unis, l'Union Européenne, le Japon ou encore le Canada permettrait d'optimiser le développement de LBPs (Cordailat-Simmons *et al.*, 2022) et d'accéder à un marché beaucoup plus étendu. À terme, une harmonisation de ces démarches simplifierait le développement de médicaments innovants contenant des souches probiotiques.



## 6. Synthèse du chapitre III

?

?

?

- ♣ Les solutions pharmacologiques destinées à traiter la douleur viscérale sont limitées et relativement peu efficaces, sans compter qu'elles sont responsables, pour la plupart, d'effets indésirables.
- ♣ Le microbiote intestinal est un acteur clé dans la physiologie de l'hôte et dans la régulation de la douleur viscérale. C'est pour cette raison qu'il représente une nouvelle voie d'investigation dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.
- ♣ Aujourd'hui, et grâce au développement de modèles *in vitro* et *in vivo*, le potentiel thérapeutique de plusieurs souches bactériennes a été évalué. Certaines souches bactériennes exercent des activités immunomodulatrices ou neuromodulatrices conduisant à un effet antalgique.
- ♣ Alors que la plupart des souches étudiées appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, les progrès de séquençage et la meilleure connaissance du microbiote intestinal ont permis d'identifier un certain nombre d'espèces bactériennes bénéfiques pour l'Homme. Parmi elles, les probiotiques de nouvelle génération pourraient représenter une nouvelle classe de médicaments. Néanmoins, une meilleure connaissance de leur mode d'action, la démonstration de leur innocuité, une meilleure maîtrise de leur production et une évolution de réglementation européenne actuelle sont nécessaires afin d'envisager leur utilisation en tant que nouveau médicament dans le traitement des douleurs viscérales.

?

?

?



## Objectifs et stratégie expérimentale

La douleur abdominale chronique est un motif fréquent de consultation en gastroentérologie et il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement spécifique. C'est pourquoi, dans le but de traiter sinon de soulager ces patients, la recherche de nouveaux traitements antalgiques constitue une priorité. Le microbiote intestinal suscite un vif intérêt puisque sa composition semble perturbée dans de nombreuses pathologies associées à de la douleur chronique, notamment dans le cas de pathologies touchant le tractus digestif telles que les MICI ou le SII (Frank *et al.*, 2007; Tap *et al.*, 2017). L'émergence de techniques de séquençage à haut débit a permis d'accroître nos connaissances tant sur sa composition que sur sa diversité, et a révélé des signatures microbiennes liées au SII et aux MICI. Certaines espèces bactériennes voient leur population s'effondrer et leur rôle dans le maintien de la santé de l'hôte est aujourd'hui fortement envisagé (Caenepeel *et al.*, 2020). Les données de la littérature présentées dans l'**Introduction Bibliographique** de ce manuscrit suggèrent que le microbiote intestinal pourrait notamment jouer un rôle important dans le contrôle de différentes fonctions du système nerveux, faisant de lui un acteur potentiel dans la régulation du processus douloureux (Defaye *et al.*, 2019; O' Mahony *et al.*, 2017).

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été d'évaluer dans quelle mesure le microbiote intestinal pouvait moduler l'activité de cellules neuronales. Au cours de ce projet, la mise au point d'une méthode de screening avait pour objectif de tester les propriétés neuromodulatrices de souches bactériennes commensales intestinales isolées de donneurs sains sur des cellules neuronales immortalisées ainsi que sur des cultures primaires de neurones issus de DRG de rat.

Afin d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des douleurs abdominales chroniques, les souches bactériennes capables de réduire l'activation de cellules neuronales devaient être testées pour leur potentiel anti-hyperalgique dans des modèles murins de douleur viscérale. Les propriétés thérapeutiques de certaines bactéries intestinales sont actuellement très recherchées puisqu'elles pourraient constituer une nouvelle classe de médicaments : les Live Biotherapeutic Products aussi appelés probiotiques de nouvelle génération. La démonstration de leur innocuité étant une étape cruciale afin d'envisager leur utilisation chez l'Homme, une étude complémentaire avait pour objectif d'apporter les premières preuves de la non-toxicité de la souche bactérienne retenue.



Alors que la plupart des souches probiotiques exercent des effets bénéfiques en modulant la réponse immunitaire ou en restaurant la barrière épithéliale intestinale, l'interaction bactérie-neurone impliquée dans ces effets est l'une des pistes récemment envisagées (Guo *et al.*, 2019). Dans ce contexte, le troisième objectif de ce travail visait à explorer les mécanismes d'interaction entre bactéries et neurones participant à l'effet anti-hyperalgique.

Enfin, la constitution d'une collection de souches bactériennes strictement anaérobies grâce au développement d'une technique innovante développée par l'Institut BIOASTER (Bellais *et al.*, 2022) avait pour objectif d'étendre la méthode de travail adoptée au cours de ce projet à d'autres espèces du microbiote intestinal.



# Données expérimentales





---

# ARTICLE 1

---

**“Anti-hyperalgesic properties of gut microbiota: *Parabacteroides distasonis*  
as a new probiotic strategy to alleviate chronic abdominal pain”**

**Sandie GERVASON**; Mathieu MELEINE; Stéphane LOLIGNIER; Maëva MEYNIER; Jean-Yves BERTHON; Denis ARDID; Edith FILAIRE; Frédéric Antonio CARVALHO.

*Soumission prochaine prévue dans le journal PAIN*



## **Anti-hyperalgesic properties of gut microbiota: *Parabacteroides distasonis* as a new probiotic strategy to alleviate chronic abdominal pain**

**Sandie GERVASON<sup>1</sup>**, Mathieu MELEINE<sup>1</sup>, Stéphane LOLIGNIER<sup>1</sup>, Maëva MEYNIER<sup>1</sup>, Jean-Yves BERTHON<sup>2</sup>, Denis ARDID<sup>1</sup>, Edith FILAIRE<sup>3</sup>, Frédéric Antonio CARVALHO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>NeuroDol, UMR 1107 INSERM, University of Clermont-Auvergne, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup>GREENTECH SA, 63360 Saint-Beauzire, France.

<sup>3</sup>ECREIN team, Human Nutrition Unit (UNH), UMR 1019 INRA-UCA, University of Clermont-Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France.

### Corresponding authors:

Frédéric Antonio Carvalho. Address: NeuroDol UMR 1107 INSERM, University of Clermont-Auvergne, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand France. Tel: +33 4 73 17 81 03. E-mail address: [frederic.carvalho@inserm.fr](mailto:frederic.carvalho@inserm.fr).

Edith Filaire. Address: ECREIN team, Human Nutrition Unit (UNH), UMR 1019 INRA-UCA, University of Clermont-Auvergne, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand, France. Tel: +33 6 48 03 51 98. E-mail address: [edithfilaire@gmail.com](mailto:edithfilaire@gmail.com).

### **ABSTRACT**

The potential role of gut microbiota in pain modulation is arousing an emerging interest since recent years. This study investigated neuromodulatory properties of gut microbiota to identify next generation probiotics in order to propose alternative therapies for visceral pain management. Neuromodulation ability of 10 bacterial strains isolated from healthy donor was assessed both on ND7/23 immortalized cell line and primary neuronal cells from rat DRG. This screening highlighted the neuroinhibitory property of *Parabacteroides distasonis* (F1-2) strain, supported both by its intracellular content and membrane fraction, which was further investigated in visceral pain mouse models. Oral administration of F1-2 resulted in a significant 1.37-fold decrease of colonic hypersensitivity (CHS) in dextran sulfate sodium (0,5%) model associated with low-grade inflammation ( $p < 0.05$ ) and 1.98-fold decrease of CHS in *Citrobacter rodentium* post-infectious models ( $p < 0.05$ ). No effect of F1-2 oral administration on CHS was observed in a neonatal maternal separation stress model. Anti-hyperalgesic effect unlikely



involved modulation of inflammatory processes or restoration of intestinal barrier. Exploration of direct dialogue mechanisms between this strain and nervous system, assessed by calcium imaging experiments, revealed that F1-2 interacts directly with nociceptors by reducing activation level upon capsaicin, inflammatory soup and bradykinin stimulations. Our study provides new insights about bacteria-host interaction and places *P. distasonis* as a potential therapeutic strategy in the treatment of visceral pain observed in leaky-gut associated pathologies.

**Key words:** Gut microbiota, visceral pain modulation, anti-hyperalgesia, *Parabacteroides distasonis*.

## 1- INTRODUCTION

In addition to dysregulation of immune response, change in stool consistency and frequency, the development of chronic abdominal pain is part of symptomatology associated with Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and Irritable Bowel Syndrome (IBS) [1-3]. Due to its complex etiology, IBS treatments aim at relieving patients rather than treating pathology and remain poorly effective [4]. Considering IBD, anti-inflammatory drugs or immunomodulators offer a large therapeutic arsenal to control inflammation but management of chronic abdominal pain remains challenging mainly because of intestinal adverse effects associated with analgesic pharmacological therapies [5].

Impairments of the microbiota-gut-brain tripartite communication are well-established feature of many intestinal pathologies, and dysbiotic microbiome is now recognized as a hallmark of IBS and IBD with a relative decrease in Firmicutes and an increase in Bacteroidetes and Enterobacteriaceae [6-9]. At peripheral level, despite pain sensation may be initiated through inflammatory mediators release triggered by microbial signals, recent evidences revealed that direct interaction between microbial cells and nervous system is possible and could lead to subsequent pain signaling and associated comorbidities [10-15]. Recent reports also suggest beneficial effects of some prevalent bacterial species with reduced abundancy in several pathologies. Some of them, such as *Faecalibacterium prausnitzii* [16-18], *Akkermansia muciniphila* [18-19] or *Parabacteroides distasonis* [21-23] display anti-inflammatory or anti-nociceptive properties although mechanism of action driving the neuromodulatory effect of these species remain poorly understood and seems to be dependent on the bacterial strain.

In sight of the emerging role of the microbiota in pain processing, the modulation of its composition has become a novel strategy to relieve visceral pain. This modulation by several ways can be effective in more or less long term. Among these, “biotics” products are gaining a



great interest [24-27] since those treatments rely on administration of commensal bacteria generally well-tolerated compared with pharmacological therapies often responsible for adverse effects. A focus is now made on “Live Biotherapeutic Products” defined as live microorganisms with ability to treat or cure symptoms or diseases unlike most of the current probiotics used as dietary supplements [28]. In this regard, our work compared firstly the neuromodulatory capacity of several bacterial fractions from different species isolated from healthy donors to identify a potential candidate to reduce visceral pain in mouse models with different etiologies characterized by colonic hypersensitivity (CHS). This screening highlighted *Parabacteroides distasonis* reference strain F1-2 as a potent neuroinhibitory probiotal strain with anti-hyperalgesic properties in pain models associated with increased intestinal permeability. After having identify potential candidate, further experiments were secondly performed to identify molecular mechanisms and cellular pathways involved in the effect of this F1-2 strain.

## 2- MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial cells

#### 2.1.1. Bacterial strain isolation, identification, growth conditions and fractioning

Bacterial strains were isolated from feces of a male healthy donor, (34 years, 178 cm, BMI: 22.1 kg.m<sup>-2</sup>) without gastrointestinal symptoms and antibiotics treatment for the past 6 months, who provided a written informed consent. Feces samples were processed within one hour of donation in anaerobic condition. To limit oxygen exposure, they were expressly transferred in an anaerobic chamber filled with N<sub>2</sub> (85%), H<sub>2</sub> (5%) and CO<sub>2</sub> (10%). YBHI culture medium used for anaerobic bacteria isolation, containing Brain Heart Infusion (37 g.L<sup>-1</sup>) and Yeast extract (5 g.L<sup>-1</sup>), was supplemented with D-Maltose (1 g.L<sup>-1</sup>), D-cellobiose (1 g.L<sup>-1</sup>), L-cysteine hydrochloride (0.5 g.L<sup>-1</sup>), Hemin (10 mg.L<sup>-1</sup>), agar (14 g.L<sup>-1</sup>) and was adjusted at pH 6.9. After 48h incubation at 37°C in strict anaerobic conditions, bacterial isolates were purified on fresh agar medium and tested for their oxygen susceptibility. Each colony unable to develop after 1h of oxygen exposure was selected and identified by 16s rRNA sequencing. Ten anaerobic bacterial isolates were characterized and stocked at -80°C with 20% of glycerol.

For bacterial screening, all anaerobic bacterial isolates were cultivated in complex anaerobic medium containing Neutralized soya peptone (10 g.L<sup>-1</sup> OXOID), Yeast extract (15 g.L<sup>-1</sup> OXOID), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.9 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.9 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (0.9 g.L<sup>-1</sup>), sodium acetate (2.7 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.09 g.L<sup>-1</sup>), L-cysteine hydrochloride (1 g.L<sup>-1</sup>), D-glucose (20 g.L<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (4 g.L<sup>-1</sup>), maltose (0.5 g.L<sup>-1</sup> Sigma), cellobiose (0.5 g.L<sup>-1</sup> Sigma), adjusted at pH 6.9 at 37°C



during 24 to 48h. Biomass of each bacterial isolate was harvested by centrifuging whole culture 30 minutes at 5000g at 4°C and suspended in physiological solution composed by NaCl (140 mM), KCl (3 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), D-Glucose (10 mM), HEPES (10 mM) adjusted at pH 7.4. Cells suspensions were mechanically lysed by high-pressure homogenizer at 2.6 kbar (One shot cell disrupter from Constant systems Ltd) allowing efficient lysis of bacterial cells. Lysed biomass was centrifuged at 5000g during 15 min at 4°C to separate insoluble fraction (bacterial membranes or biomass) to intracellular content (also called lysate). Intracellular content was sterilized by filtration (0.2 µm). Each bacterial fraction was stocked at -80°C before being tested for its neuromodulatory potential.

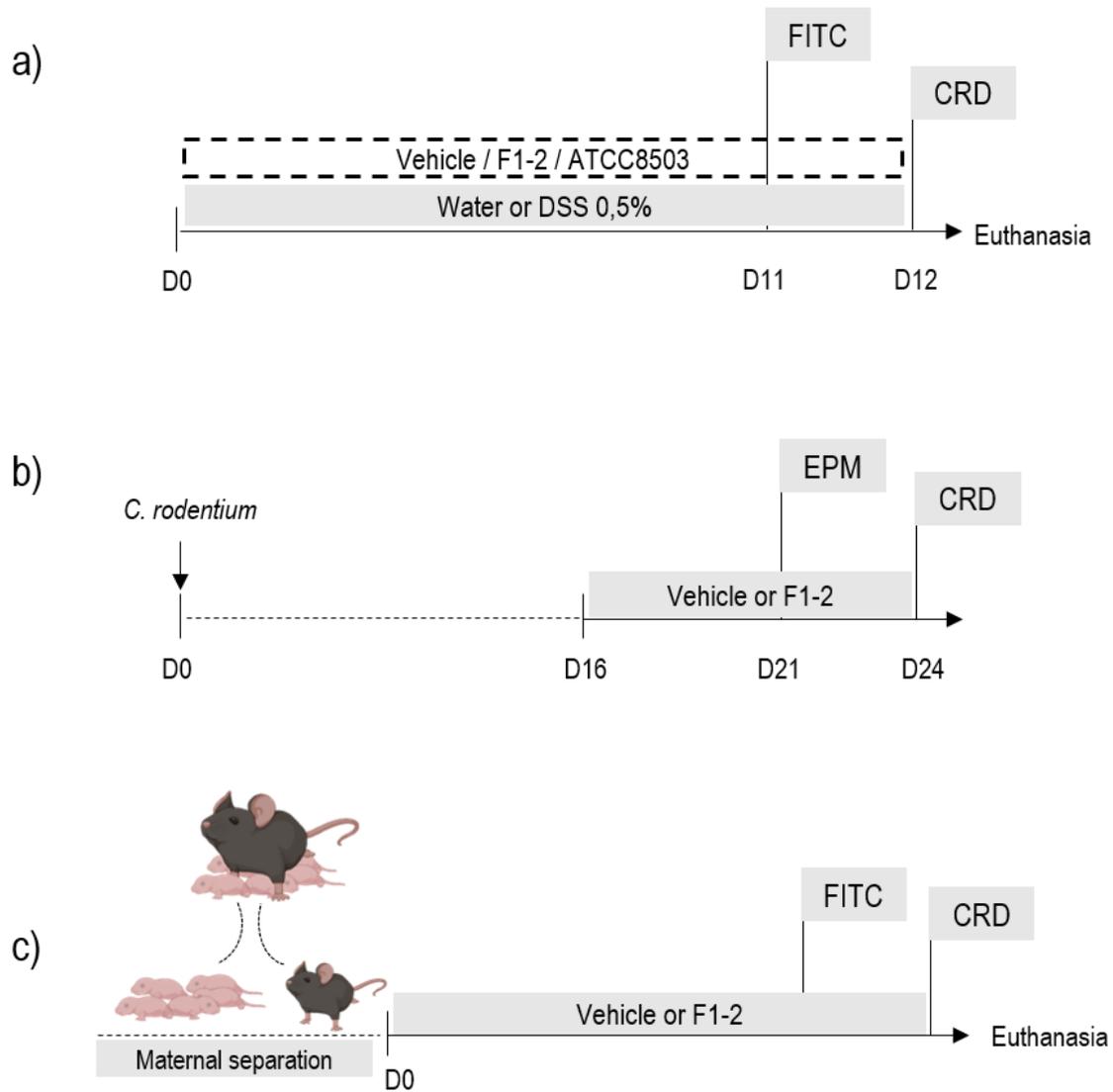
### **2.1.2. *Parabacteroides distasonis* growth conditions**

*Parabacteroides distasonis* (isolate F1-2 (CNCM I-5828) and corresponding reference strain from ATCC collection (ATCC®8503<sup>TM</sup>)) were cultivated in 5L bioreactor containing complex anaerobic medium as described above. Anaerobic conditions were maintained by continuous injection of a gas mixture (N<sub>2</sub> (85%), H<sub>2</sub> (5%) and CO<sub>2</sub> (10%)) allowing to maintain low Redox potential (-400 mV) and homogenization was ensured by 2 Rushton blades with an agitation rate of 150 rpm. Bioreactor culture was conducted during 24h with a controlled temperature of 37°C and reached OD<sub>600nm</sub> of 6. Biomass of *P. distasonis* was harvested by centrifuging whole culture 30 minutes at 5000 g at 4°C in anaerobic condition to maintain cell viability and conserved in PBS supplemented with 20% of glycerol. Bacterial titer was estimated between 1,52 x 10<sup>10</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> to 2.06 x 10<sup>10</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> according to the batch production by count on brucella blood agar medium (BBA).

## **2.2. *In vivo* experiments**

### **2.2.1. *Animals and ethic statements***

Male C57Bl/6 mice (6-9 weeks old), and male Wistar rats were obtained from Janvier laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France). Male C57Bl/6 mice Nav1.8-Cre-GFP were obtained by crossing mT/mG mice with Nav1.8-Cre mice [29] (from Jackson Laboratory). Mice and rats were housed in a temperature-controlled room (21±1°C) under standard conditions, with access to food and water *ad libitum*. For Dextran Sulfate Sodium (DSS) induced CHS model and Neonatal Maternal Separation (NMS) mouse model, mice were housed in Specific-Pathogen-Free (SPF). For Post-infectious IBS mouse model, mice were housed in the biosafety level 2 (ABSL2) facility of University of Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France). All



**Figure 1: Experimental procedure of colonic hypersensitivity induced mouse model.** a) DSS 0,5% CHS induced mouse model. b) *Citrobacter rodentium* post-infectious IBS mouse model and c) neonatal maternal separation (NMS) mouse model. *F1-2* : *P. distasonis* *F1-2* bacterial strain; *CRD* : Colorectal distension; *DSS* : Dextran Sulfate Sodium; *EPM* : Elevated plus maze test; *FITC* : Fluorescein isothiocyanate dextran.

experiments were performed according to the ethical guidelines set out by International Association for the Study of Pain [30], complied with the European Union regulation and were approved by ethics committees: the local committees C2EA-02 of Clermont-Ferrand (approvals DSS : protocol number APAFIS 02498.01; NMS : protocol number CE110-12 and CE111-12 ; PI-IBS : protocol number EU0116-3460). The authors have read the ARRIVE guidelines, and the manuscript was prepared and revised according to the ARRIVE guidelines.

### **2.2.2. Mouse models of colonic hypersensitivity and bacterial treatments**

Three models of CHS were used. Firstly, low-grade inflammation was induced by 0.5% (w/v) of DSS (MW = 36,000-50,000 Da) dissolved in drinking water for 12 days *ad libitum*. Control group received only drinking water. A post-infectious IBS (PI-IBS) model induced by *Citrobacter rodentium* inoculation was also performed as described by Meynier *et al* [31]. Finally, a NMS model was induced by pups isolation from their mothers from day 2 to day 14, 3 hours per day as previously described [17,32]. Pups were then left with their mothers up to weaning and the experiment was performed on nine-week-old mice.

In all CHS animal models, mice were daily gavaged with 0.2 mL of  $1.52 \times 10^{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup> of *P. distasonis* F1-2 strain during 8 to 12 days according to the model. In DSS-induced CHS mouse model, mice were daily gavaged with *P. distasonis* F1-2 strain or *P. distasonis* ATCC®8503™ strain (0.2 mL of  $2.06 \times 10^{10}$  CFU.mL<sup>-1</sup>) which have been produced in the same growth conditions during 12 days (**Fig. 1a**). In PI-IBS, mice were treated with F1-2 during post-infectious phase for 8 days, from day 16 until day 23 (**Fig. 1b**) whereas hypersensitive NMS mouse were gavaged during 10 days (**Fig. 1c**).

### **2.2.3. Colonic sensitivity**

Colonic sensitivity was evaluated by quantifying intracolonic pressure variations in response to colorectal distensions (CRD) at the end of experiment in each CHS mouse mode as previously described [31]. Briefly, mice were habituated 30 min prior to experiments to reduce motion artefacts due to restraint stress. A polyethylene balloon with connecting catheter was inserted in the distal colon, 1 cm from the base of the balloon to the anus of mice, during light isoflurane anesthesia. The catheter was fixed to the tail with tape. The balloon was connected to pressure transducer to control intraballoon pressure during CRD procedure. Barostat was used to manage air infiltration and balloon pressure control. The CRD procedure allows assessing visceral pain-related responses and consisted of repeated phasic distensions of 20, 40, 60 and 80 mmHg, with a duration of 20 seconds and spaced from each other by 4 minutes.



#### **2.2.4. Anxiety-like behavior**

Anxiety-like behavior was assessed by using Elevated Plus Maze (EPM) test (ViewPoint Behavior Technology, Lissieu, France) at 21 days post infection as previously described [31]. Mice were acclimated to the room at least 45 minutes before test. Individual animal was placed in the central zone and allowed to explore the maze for 5 minutes. Mice were recorded with a camera and data were manually scored. The perform distance in the apparatus was recorded (Ethovision XT 15, Noldus). Anxiety was characterized through the number of entries in each arm (considered when the four taws are located within the arm) and time spent in open arms.

#### **2.2.5. Intestinal permeability**

*In vivo* intestinal permeability was assessed using fluorescein dextran (FITC-dextran 4000 Da, TdB labs). Briefly, fasting mice were orally gavaged with 0.6 mg.g<sup>-1</sup> of FITC-dextran per mouse body weight, after *P. distasonis* F1-2 gavage period. Three hours and a half after FITC gavage, blood samples were collected from the retro-orbital venous plexus and plasma FITC levels were determined on serum fraction by fluorometry at 488 nm using a Flexstation 3 Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices).

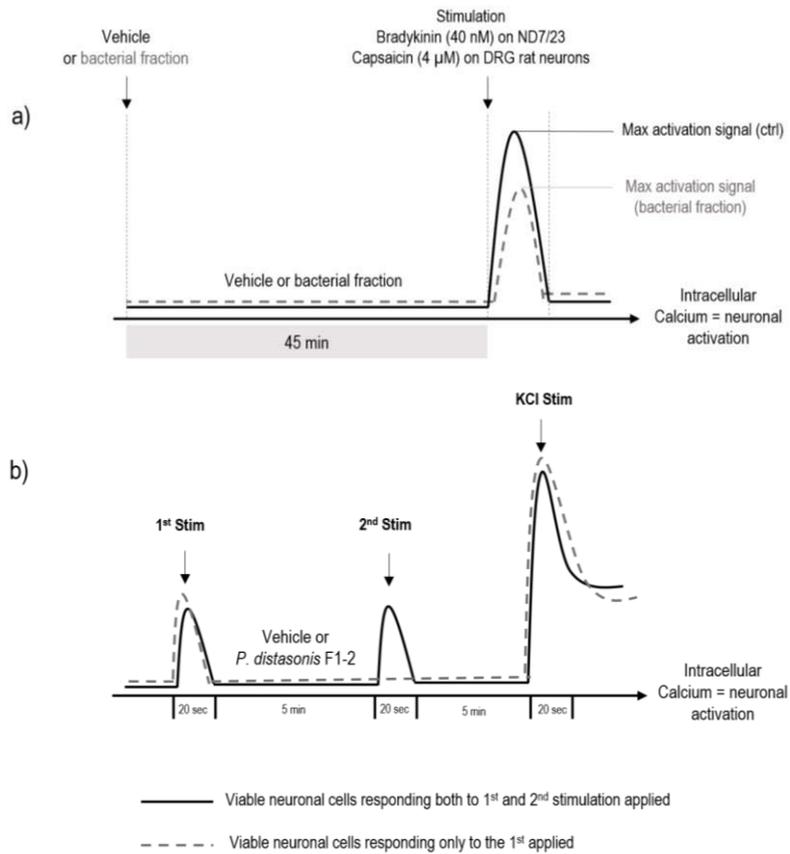
#### **2.2.6. Colonic inflammation**

Colonic section of DSS treated mice were harvested at the end of experiment and were homogenized in potassium phosphate buffer (50 mM) containing HTAB at 0.5% (w/v) (SIGMA). Supernatants were collected and frozen at -20°C. Inflammatory mediators' levels were measured by ELISA using the Duoset kit (R&D System), according to the manufacturer's instructions. Inflammatory level was assessed by measure following inflammatory mediators: Lipocalin-2, Il-1 $\beta$  and IL-8. Th1-Th2 (Bio-Plex Pro Mouse Cytokine TH1-TH2 kit, BIO-RAD) and Th17 (Bio-Plex Pro Mouse Th17 Panel kit, Bio-Rad) inflammatory pathways were followed by LUMINEX technology (BIOPLEX® Luminex 200 Bio-Rad), following supplier recommendations. Data acquisition and/or data analysis were performed on the Department of Biochemistry and Molecular Genetics of Clermont-Ferrand University Hospital.

### **2.3. In vitro experiments**

#### **2.3.1. Neuronal cells primary culture**

DRGs from male Wistar rat, male C57Bl/6 wild-type mouse and male Nav1.8-Cre-GFP C57Bl/6 mouse were explanted, cleaned of anterior and posterior roots and connective tissue



**Figure 2: Experimental procedure of *in vitro* evaluation of neuromodulatory properties of bacterial strains.** a) Neuromodulatory properties protocol-screening on ND7/23 immortalized neuronal cells and on primary neuronal cells from DRG rat. b) Evaluation of neuronal cells activation by ratiometric calcium imaging on DRG mice neurons.

**Table 1: Bacterial strains isolated from feces of healthy male donor.** 10 bacterial isolates were selected based on their oxygen susceptibility on agar medium and identified by 16S rRNA sequencing.

Isolate Denomination	Species Identity (16S rRNA sequencing)
A2-3	<i>Escherichia/Shigella coli</i> group
F1-2	<i>Parabacteroides distasonis</i>
NEO0037	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
A2-2	Unknow (not identified)
F1-1	<i>Bifidobacterium longum</i>
G2-1	<i>Clostridium citroniae</i>
G1-2	<i>Bifidobacterium animalis</i>
NEO0060	<i>Hafnia alvei</i>
A1-7	Unknown (not identified)
G1-1	<i>Actinomyces turinensis</i>

and digested by enzyme mix containing Collagenase type III (5 mg.mL<sup>-1</sup>; Worthington) and Dispase (10 mg.mL<sup>-1</sup>; Gibco), for 45 min to 1h15 at 37°C. DRG suspension was centrifuged at 175 g for 15 seconds after which the supernatant was removed and replaced by 1 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; SIGMA). The DRG suspension was triturated through fire polished Pasteur pipettes and spined at 175 g for 5 seconds. The supernatant containing dissociated cells was saved at each trituration step. Trituration was repeated 6 times for mice DRG and 9 times for rat DRG using 3 fire polish Pasteur pipettes of decreasing diameter. Cell solution was spined for 5 min at 175 g. Supernatant was removed and replaced by 400 µL of DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, sodium pyruvate (110 mg.mL<sup>-1</sup>), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 µg.mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 µg.mL<sup>-1</sup>), vitamins, amino acids (MEM NEAA, Gibco) and NGF (6.25 pg.mL<sup>-1</sup>). Four microliters of the cell suspension from rat DRG were plated in 96 wells microplates (Krystal 96-well plate with glass bottom black colour; Dutsher) for bacterial screening experiment. For ratiometric calcium imaging experiments, 20 µL of cell suspension from mice DRG were plated on poly-L-Lysine (100 µg.mL<sup>-1</sup>) and laminin (200 µg.mL<sup>-1</sup>) coated glass coverslips. Cells were incubated during 30 minutes at 37°C before adding DMEM supplemented medium. Cells were then incubated at 37°C overnight up to experiments.

### ***2.3.2. Global calcium imaging in cultured cells***

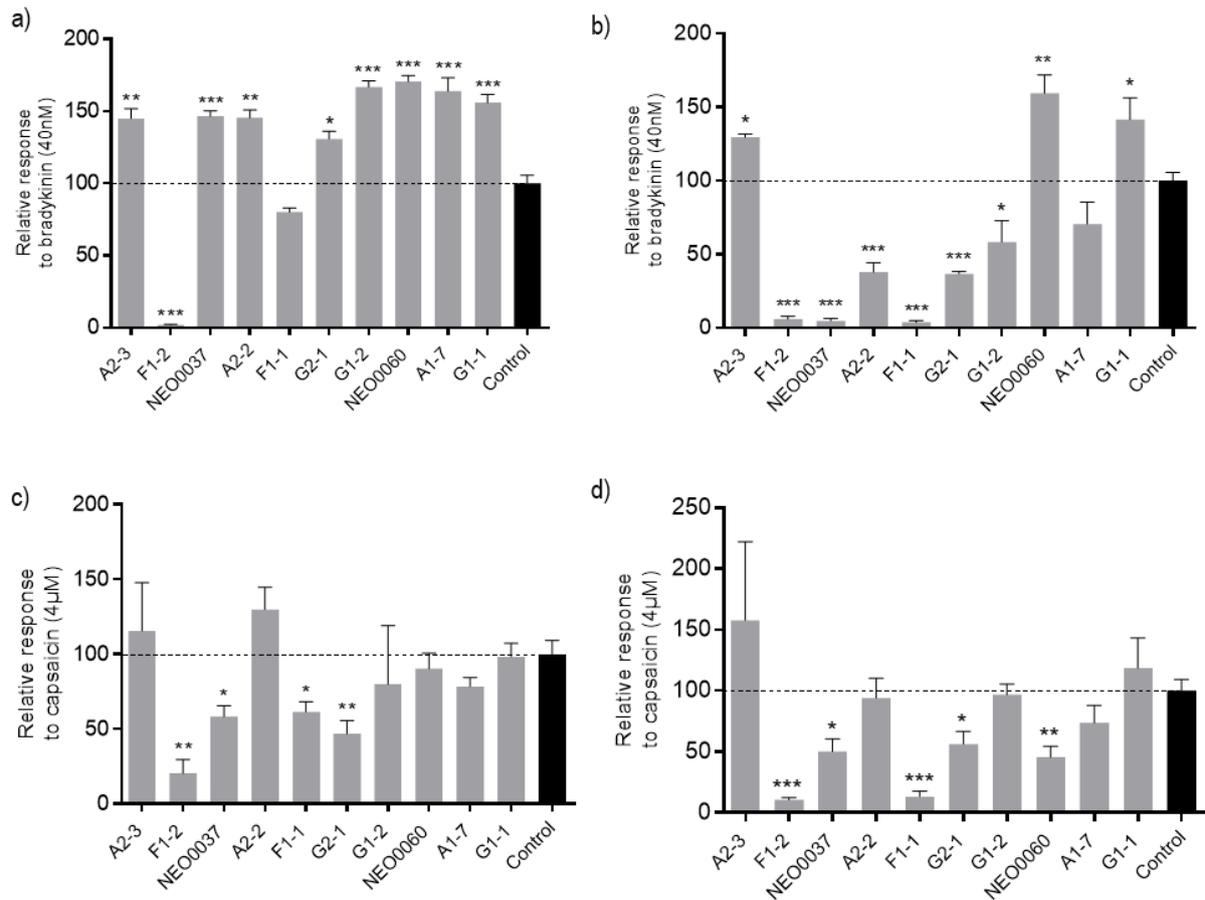
To assess neuromodulatory potential of bacterial fractions, first approach was to evaluate the global signal of neuronal cells in culture. First, screening has been made on ND7/23 immortalized neuronal cell line (from European Collection of Authenticated Cell Culture, Merck, France) generated by fusion of cultured neonatal rat DRG neurons with N18TG2 mouse neuroblastoma cells [33]. This immortalized cell line has been characterized as a sensory neuron model [34,35]. ND7/23 cells were cultivated in 15 mL of DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, sodium pyruvate (110 mg.mL<sup>-1</sup>), L-glutamine (2 mM), and penicillin (100 µg.mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 µg.mL<sup>-1</sup>) in 75-cm<sup>2</sup> culture flask. At 80% confluence, cells were detached from the substrate, centrifuged at 175 g for 5 minutes and suspended in ND7/23 fresh culture medium at  $8.0 \times 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup>. ND7/23 suspension was plated on 96 microplate wells (Greiner bio-one 655096) at  $8.0 \times 10^4$  cells/well and incubated at 37°C overnight. After 24h of incubation, culture medium was removed and replaced by 81 µL of calcium probe (Kit FLIPR Calcium 6-QF, Molecular Devices,  $\lambda$ 485 nm (excitation) and  $\lambda$ 525 nm (emission)) and 81 µL of HBSS (Hank's Buffered Salt solution)-HEPES buffer 20 mM (adjusted at pH 7.4, 300



mOsm). Cells were incubated with calcium probe during 2h at 37°C, following supplier recommendations. Bacterial fractions were injected in each microplate well following neuronal activation with Flexstation 3 Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices) during 3 minutes after injection. ND7/23 were incubated with bacterial fractions during 45 minutes before being stimulated with bradykinin (40 nM). Neuronal activation was followed during 3 minutes after stimulatory injection (**Fig. 2a**). Data analysis consists in maximum signal to stimulation determined on F-F0 normalized kinetic. Maximum signal to stimulatory solution relative to control was calculated. Based on the similar approach described above, neuromodulatory potential of bacterial fraction was also tested on DRG Wistar rat primary neuronal cells (from Janvier laboratories) stimulated with capsaicin (4  $\mu$ M) instead of bradykinin.

### ***2.3.3. Single cell ratiometric calcium imaging***

To explore interaction that occurs between bacterial cells and DRG mice neuronal cells, another approach has been adopted. By contrast with global calcium imaging previously described above, single cell ratiometric calcium imaging technical approach has been preferred because of its capability to monitor calcium signaling of single and isolated neuron represented by single spike resolution. In these experiments, intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  was followed with  $\text{Ca}^{2+}$  ratiometric dye Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura 2-AM, Invitrogen). DRG mice neurons were loaded with Fura-2 solution (4  $\mu$ M) supplemented by pluronic acid (1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 45 minutes at 37°C with slight agitation (40 rpm). All imaging experiments were performed at 32°C in a dark room. After loading, glass coverslip was mounted in an imaging/perfusion chamber equipped with perfusion valve system which was mounted and viewed through an inverted microscope. Neuronal cells were alternatively illuminated with 340 nm and 380 nm wavelengths. The exposure time to excitation was 400 ms for each wavelength. Image pairs were acquired every 2 seconds. All calcium imaging experiments consisted on 2 stimulations spaced by 5 min incubation with  $2.4 \times 10^8$  *P. distasonis* F1-2 viable cells suspension after being rinsed with Tyrode buffer solution (**Fig. 2b**). Capsaicin (SIGMA), Inflammatory soup composed by bradykinin acetate salt (SIGMA), serotonin hydrochloride (SIGMA), Prostaglandin E2 (Sellesckchem), Histamine dichlorhydrate (SIGMA) adjusted at pH6, or potassium chloride (30 mM) were tested. A lastly KCl (50 mM) stimulation was assessed at the end to evaluate cell viability. Tyrode buffer solution was composed as followed: NaCl (140 mM), KCl (3 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1 mM),  $\text{CaCl}_2$  (2 mM), D-Glucose (10 mM), HEPES (10 mM) adjusted at pH7.4. Osmolarity was also adjusted at 300 mOsm. KCl solution was composed as



**Figure 3: Commensal strict anaerobic bacteria modulate neuronal responses to nociceptive stimulation *via* direct interaction.** (a) and (b)  $\text{Ca}^{2+}$  responses of ND7/23 neuronal cells loaded with calcium probe (FLIPR Calcium 6 QF) stimulated with bradykinin (40 nM) after 45 min incubation respectively with (a) insoluble fraction (biomass) or (b) intracellular bacterial cells content. (c) and (d)  $\text{Ca}^{2+}$  responses of primary neuronal cells from DRG rat loaded with calcium probe (FLIPR Calcium 6 QF), stimulated with capsaicin (4  $\mu\text{M}$ ), after 45 min incubation with insoluble fraction (c) or intracellular bacterial cell content (d). Bar graphs represent maximum peaks values on normalized F-F0 relative to control. Each point represents an average of 3 to 4 independent readings for each bacterial fraction and 15 to 16 independent readings for control. Mean  $\pm$  SEM.

followed: NaCl (93 mM), KCl (50 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), CaCl<sub>2</sub> (2 mM), D-Glucose (10 mM), HEPES (10 mM) adjusted at pH7.4. Osmolarity was also adjusted at 300 mOsm. Data analysis was assessed on  $\Delta F/F_0$  normalized kinetics and consisted in clusterization of neuronal sub populations. For each experiment, 2 sub populations have been identified. First population corresponded to neuronal cells responding both to the first and the second stimulation applied. Second population corresponded to neuronal cells only responding to the first stimulation. All neuronal cells included in analysis responded to KCl final stimulation and were considered as viable neurons (**Fig. 2b**).

#### 2.4. Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, USA). D'Agostino-Pearson test and Shapiro-Wilk test have been used to check if data follow a normal distribution. Mann-Whitney test and Student t test were used to compare two groups. One-way ANOVA, Kruskal-Wallis test or two-way ANOVA were used for intergroup-comparisons with Tukey's, Dunn's and Dunnett's test to compare more than two-groups. To compare populations between two conditions, Chi square test was used. A p value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

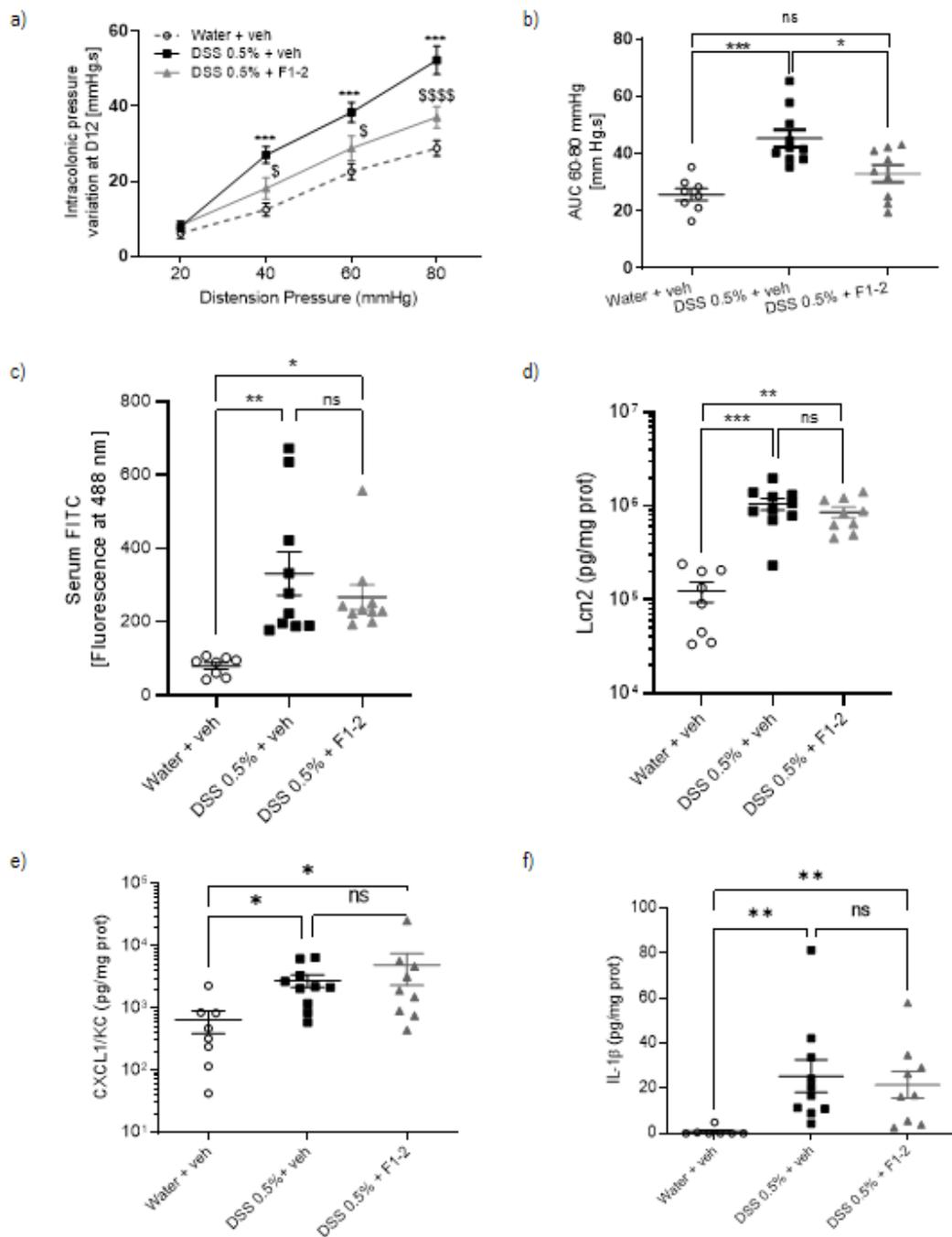
### 3- RESULTS

#### 3.1. Commensal strict anaerobic bacteria fractions modulate neuronal responses to nociceptive stimulation *via* direct interaction.

Isolation step made possible to constitute a 10 bacterial strains collection selected on their oxygen susceptibility (**Table 1**). Among all the tested biomasses, screening results revealed that only F1-2 biomass displayed an inhibitory effect on calcium response following bradykinin stimulation on ND7/23 cells in culture (**Fig. 3a**). About the intrabacterial contents, most of them inhibited calcium response to bradykinin on ND7/23 cells in culture, with a strong reduction observed following incubation with F1-2, NEO0037 and F1-1 soluble fractions (**Fig. 3b**).

In DRG neuronal cells primary culture, four biomasses displayed an inhibitory effect on calcium response following capsaicin stimulation while the others had no significant effect (**Fig. 3c**). However, most of the intracellular contents showing inhibitory effect in ND7/23 cells also reduced DRG neurons response to capsaicin (**Figs. 3b and d**).

F1-2 bacterial strain was the only one to carry inhibitory activity both in its biomass and in its intracellular content in ND7/23 cells and DRG neurons. This particular strain, identified as *Parabacteroides distasonis*, was further explored to test its effect on colonic sensitivity in CHS mouse models.



**Figure 4: Administration of *Parabacteroides distasonis* F1-2 alleviates colonic hypersensitivity independently of intestinal barrier reinforcement or proinflammation resolution in a DSS-CHS induced model.** CHS was induced using 0,5% DSS for 12 days. Mice were daily gavaged with vehicle or *P. distasonis* F1-2 or vehicle. (a) Visceromotor response to colorectal distension in control (water + vehicle) mice (n = 8), DSS 0,5% + vehicle treated mice (n = 10), DSS 0,5% + *P. distasonis* F1-2 (n = 9) treated mice was assessed at D12. (b) The area under curve (AUC) was calculated between 60 and 80mmHg for the different groups. (c) Intestinal permeability was assessed at D11 using FITC-dextran tracer. (d) Lipocalin 2, (e) CXCL1/KC (IL-8) and (f) IL-1 $\beta$  colonic level were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in DSS and DNBS visceral pain mouse model. Mean  $\pm$  SEM. \* : Water + Veh vs. DSS 0,5% + Veh. \$ : DSS 0,5% + Veh vs. DSS 0,5% + F1-2.

### **3.2. Administration of *Parabacteroides distasonis* F1-2 alleviates colonic hypersensitivity independently of intestinal barrier reinforcement or proinflammation resolution in a DSS-induced CHS model.**

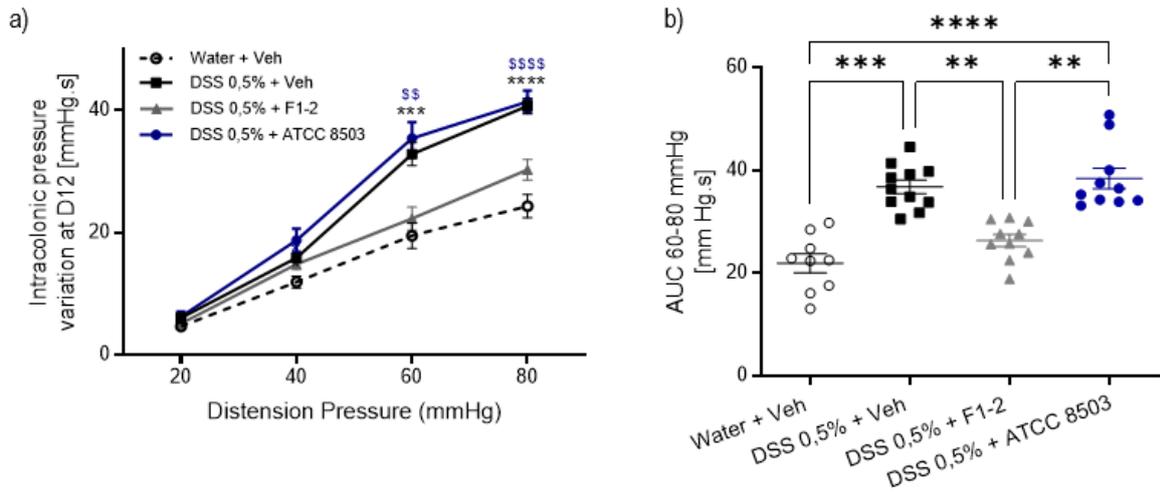
A significant CHS was developed in mice treated with DSS ( $p < 0.001$  at 40, 60 and 80 mmHg) (**Figs. 4a and b**). Oral administration of *P. distasonis* F1-2 significantly reduced CHS (**Fig. 4a**) (DSS + veh vs. DSS + F1-2:  $p < 0.05$  at 40 and 60 mmHg;  $p < 0.0001$  at 80 mmHg) illustrated by 1.37-fold decrease of AUC between 60 and 80 mmHg in F1-2 treated mice compared to DSS treated mice (**Fig. 4b**). The anti-hypersensitive effect exerted by F1-2 was compared to that of the reference strain ATCC®8503™ belonging to the same species and that shares 99.51% 16S RNA sequence homology with F1-2. Results of CRD suggested that, unlike F1-2 strain, reference strain had no effect on CHS induced by DSS treatment (**Fig. S1a and b**).

Measurement of intestinal barrier disruption highlighted a higher permeability after DSS treatment ( $p < 0.001$ ) that was not significantly reduced by *P. distasonis* F1-2 administration (**Fig. 4c**).

Colonic inflammation, evaluated by Lipocalin 2 (Lcn2), CXCL1/KC and IL-1 $\beta$  levels, was increased in DSS-treated mice but remained unchanged after F1-2 treatment (**Figs. 4d, e and f**). Colonic inflammation severity was further evaluated by LUMINEX technology. Th1-Th2 and Th17 inflammatory pathways were targeted and none of 18 cytokines measured was significantly increased after DSS treatment (**Fig. S2**).

### **3.3. *P. distasonis* F1-2 alleviates colonic hypersensitivity but not anxiety-like behavior in post-infectious IBS mouse model.**

As previously described [31], *Citrobacter rodentium* inoculation induced CHS after pathogen clearance by increasing intracolonic pressure to colorectal distension ( $p < 0.05$  at 60 mmHg and  $p < 0.01$  at 80mmHg) (**Figs. 5a and b**). Oral administration of F1-2 during 8 days significantly reduced chronic colonic hypersensitivity in this model ( $p < 0.01$  at 80mmHg) (**Fig. 5a**) illustrated by 1.98-fold decrease of AUC between 60 and 80 mmHg in F1-2 treated mice compared to infected mice group (**Fig. 5b**). Post-infectious anxiety-like behavior in *Citrobacter rodentium* infected mice has already been described [31]. This result was confirmed in our study by an increase of the number of entries ( $p < 0.01$ ) (**Fig. 5c**) and time spent in open arms ( $p < 0.01$ ) (**Fig. 5d**) during EPM test. F1-2 treatment had no beneficial effect on anxiety-like behavior in this model (**Figs. 5c and d**).



**Figure S1: Administration of *Parabacteroides distasonis* F1-2 but not *P. distasonis* ATCC 8503 prevents colonic hypersensitivity in DSS-CHS induced mouse model.** CHS was induced using 0,5% DSS for 12 days. Mice were daily gavaged with vehicle or *P. distasonis* F1-2 or *P. distasonis* ATCC 8503. (a) Visceromotor response to colorectal distension in control (water + vehicle) mice (n = 9), DSS 0,5% + vehicle treated mice (n = 11), DSS 0,5% + *P. distasonis* F1-2 (n = 10) or DSS 0,5% + *P. distasonis* ATCC 8503 (n = 10) treated mice was assessed at D12. (b) The area under curve (AUC) was calculated between 60 and 80mmHg for the different groups. Mean  $\pm$  SEM.

**Figure S2: Immunomodulatory properties of *P. distasonis* F1-2 in DSS (0,5%) CHS induced mouse model.** Mean  $\pm$  SEM.

	(pg/mL)	Ctrl + Veh	DSS 0,5% + Veh	DSS 0,5% + F1-2
Th1/Th2	IL-2	0,27 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,06
	IL-4	0,21 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,04
	IL-5	0,54 $\pm$ 0,20	0,27 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,06
	IL-10	1,48 $\pm$ 0,42	2,97 $\pm$ 1,29	1,66 $\pm$ 0,32
	IL-12	0,30 $\pm$ 0,16	0,37 $\pm$ 0,18	0 $\pm$ 0
	IFN- $\gamma$	0,38 $\pm$ 0,11	0,38 $\pm$ 0,13	0,62 $\pm$ 0,27
	TNF $\alpha$	0,82 $\pm$ 0,16	0,76 $\pm$ 0,11	0,47 $\pm$ 0,14
	GM-CSF	0,19 $\pm$ 0,19	0 $\pm$ 0	0,27 $\pm$ 0,27
	IL-17F	1,49 $\pm$ 0,31	1,31 $\pm$ 0,11	1,75 $\pm$ 0,25
	IL-21	3,48 $\pm$ 3,48	0 $\pm$ 0	3,71 $\pm$ 3,71
Th17	IL-22	0,81 $\pm$ 0,32	2,20 $\pm$ 0,67	3,63 $\pm$ 1,08
	IL-23	0,97 $\pm$ 0,97	0 $\pm$ 0	0,57 $\pm$ 0,57
	IL-31	241,99 $\pm$ 33,27	191,48 $\pm$ 19,27	248,15 $\pm$ 43,43
	IL-33	53,10 $\pm$ 8,55	85,04 $\pm$ 12,37	82,48 $\pm$ 11,01
	CD40-L	7,79 $\pm$ 3,04	3,29 $\pm$ 2,55	11,47 $\pm$ 5,81
	MIP-3a	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	IL-25	1,73 $\pm$ 1,05	1,96 $\pm$ 1,79	1,86 $\pm$ 1,27
IL-27	0,89 $\pm$ 0,33	0,20 $\pm$ 0,068	1,99 $\pm$ 1,17	

### **3.4. Administration of *P. distasonis* F1-2 do not modify colonic hypersensitivity in a non-inflammatory IBS mouse model.**

Our previous experiments showed the efficacy of F1-2 treatment in two models of CHS associated with intestinal hyperpermeability. In order to evaluate the impact of F1-2 strain in a model with a different etiology and without permeability impairments we used a NMS paradigm protocol to induce long term CHS [36]. Results of CRD showed that F1-2 has no effect on CHS in this NMS model (**Figs. 6a and b**) suggesting that intestinal barrier disruption may be required to observe a beneficial effect of F1-2 strain (**Fig. 6c**).

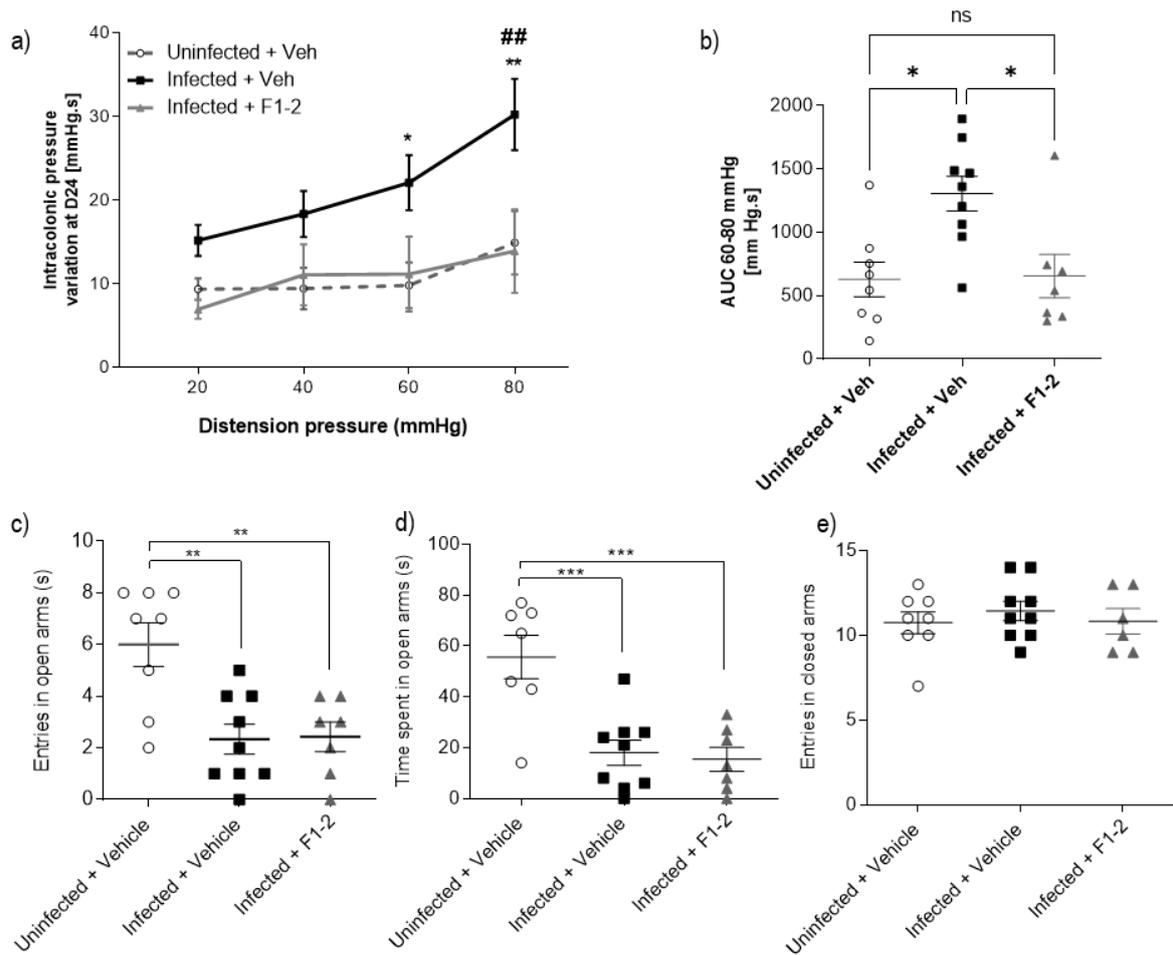
### **3.5. *P. distasonis* F1-2 decreases nociceptors activation level.**

Mouse DRG neurons in culture were submitted to 2 challenges with high concentration KCl (30 mM), capsaicin (1  $\mu$ M) or inflammatory soup. In between, cells were incubated either with F1-2 strain or vehicle. Incubation of DRG neurons with F1-2 strain for 5 minutes did not affect the percentage of cells activated by a high KCl concentration used as a pan-neuronal stimulation (**Fig. 7a**). Interestingly, whereas 5.17% of the cells were desensitized to a second capsaicin challenge in the control group, this rate reached 17.72% in cells incubated with F1-2 (**Fig. 7b**). Among cells responding to inflammatory soup stimulation at the 1<sup>st</sup> challenge, 12.7% of cells were inactivated at the second challenge in the control group whereas up to 32.2% did not respond when incubated with F1-2 (**Fig. 7c**).

To further explore the effect of F1-2 strain on nociceptors activation, the same kind of experiments was performed on DRG neurons cultures stemming from Nav1.8-Cre-GFP mice. F1-2 significantly increased the percentage of non-responding cells to the second capsaicin stimulation in Nav1.8 expressing cells ( $p < 0.001$ ) and Nav1.8 negative neurons ( $p < 0.05$ ) compared to control group (**Fig. 7d**). When neuronal cells were stimulated with inflammatory soup, the percentage of non-responding cells was significantly increased in Nav1.8 positive neurons ( $p < 0.01$ ) and no significant effect was observed in Nav1.8 negative cells (**Fig. 7e**).

### **3.6. *P. distasonis* F1-2 decreases activation signal of neuronal cells stimulated with bradykinin.**

As previously described, F1-2 had a very potent effect in ND7/23 cells following bradykinin stimulation and also in DRG neurons after inflammatory soup challenge containing bradykinin. This is why we focused the next experiment on neuromodulation property of F1-2 strain after bradykinin stimulation in DRG neurons. In a first experiment, we assessed the effect of F1-2 strain on primary neuronal cells from DRG mice stimulated by inflammatory soup containing (IS (+) BK) or deprived (IS (-) BK) of bradykinin or bradykinin alone (BK) by single cell calcium imaging (**Fig 2b**). Results indicated that 5 min contact with F1-2 bacterial strain



**Figure 5: *P. distasonis* F1-2 alleviates colonic hypersensitivity but not anxiety like behavior in post-infectious IBS mouse model.** Mice were infected with *C. rodentium* at D0 before being gavaged with *P. distasonis* F1-2 or vehicle between D16 to D24. (a) Visceromotor response to colorectal distension in uninfected mice (n=8), Infected + vehicle mice (n=9) and *P. distasonis* F1-2 infected treated mice (n=7) was assessed at D24. (b) Area under curve between 60 and 80 mmHg for the different groups. Behavioral effect on anxiety-like behavior was evaluated with Elevated Plus Maze test (EPM) at day 21. (c) entries in open arms, (d) time spent in open arms and (e) entries in closed arms was measured during 5 minutes. Mean  $\pm$  SEM. \* *Uninfected + Veh vs. Infected + Veh*. # : *Infected + Veh vs. Infected + F1-2*.

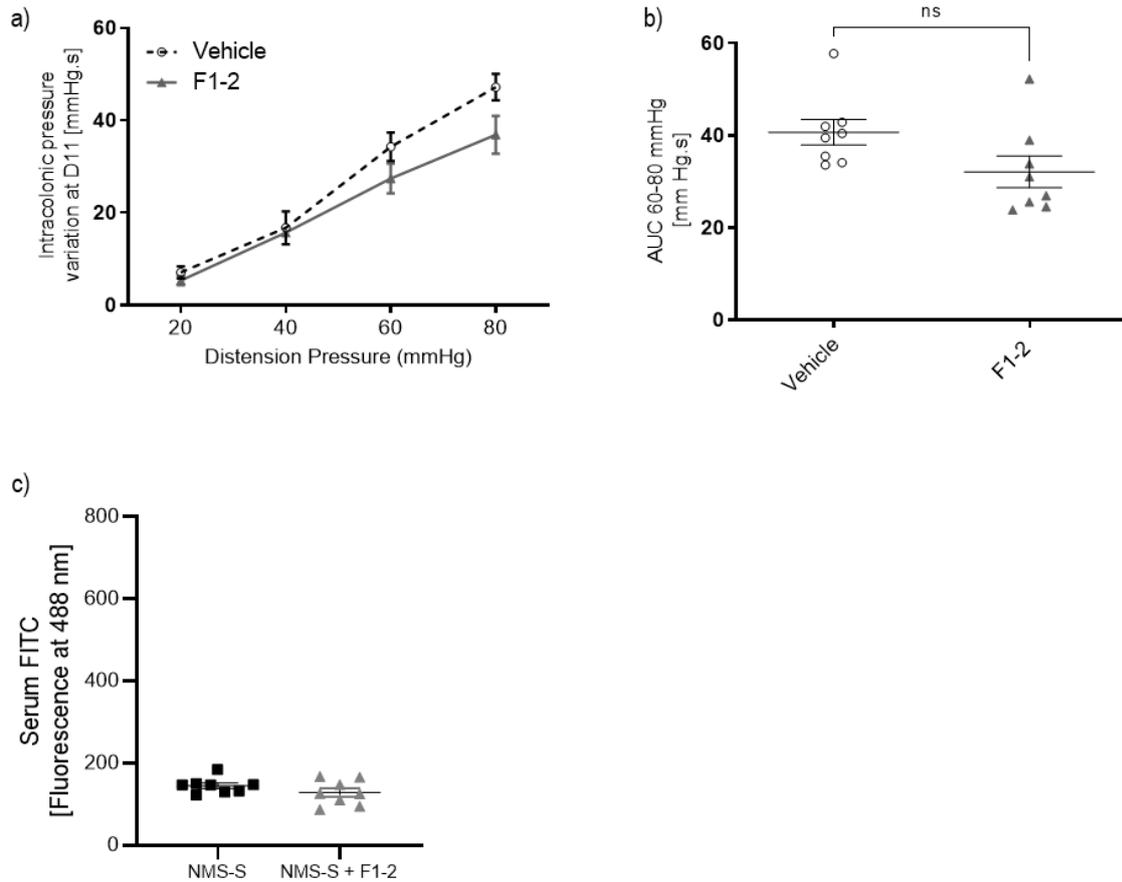
increased the number of neuronal cells not responding to the second IS (+) BK stimulation in accordance with the previous results (**Fig.7c and 8a**). This effect was lost when inflammatory soup was deprived of bradykinin. Finally, when neuronal cells were stimulated with bradykinin alone, whereas 39.5% of the cells were desensitized during 2<sup>nd</sup> stimulation in the control group, incubation with F1-2 strain increased the proportion of desensitized cells to 82.9% (**Fig. 8a**). In a second experiment, dose-response curve of bradykinin on immortalized ND7/23 neuronal cells was assessed after 45 min incubation with F1-2 or vehicle (**Fig. 8b**). *P. distasonis* F1-2 treatment significantly reduced maximum fluorescence intensity after bradykinin stimulation for every dose tested. Therefore, EC50 switched from 6.1 nM in the control group to 22 nM in presence of F1-2 (**Fig. 8b**).

#### 4- DISCUSSION

The present study highlighted the neuroinhibitory effect of bacterial strain *P. distasonis* F1-2 in ND7/23 immortalized neuronal cell line and primary culture of rat and mouse DRG neurons following stimulation with several algogenic substances. Moreover, this strain strongly reduced CHS solely in mice models associated with intestinal hyperpermeability supporting the hypothesis of a direct “bacteria-nervous system” interaction.

Isolation step and identification by 16s rRNA sequencing of fecal anaerobic bacteria led to the constitution of a 10 strains collection. Most of the soluble and insoluble fractions extracted from these bacterial species were able to modulate activation of ND7/23 immortalized cell line as well as DRG neuronal cells either by increasing or lowering intracellular calcium flows upon stimulation with algogenic substances. Direct neuromodulation by bacteria has been studied for few years now. In most cases, an activation of afferent neurons was shown after exposure to pathogenic strains such as *Staphylococcus aureus* [37], *Porphyromonas gingivalis* [38] or *Mycobacterium tuberculosis* [39] although dialogue mechanisms between bacteria and neurons are still poorly understood. Regarding the diversity of gut microbiota, we hypothesized that besides neuronal activation induced by a subset of pathogenic strains, some species could, by contrast, modulate neuronal activation to inhibit pain signal arising from the gut. Previous reports demonstrated the antihyperalgesic properties of several bacterial species including *Lactobacillus acidophilus*, *Faecalibacterium prausnitzii* or some *Bifidobacteria* in models of visceral pain in rodents but a direct inhibition of neuronal activation was not established so far [35].

*P. distasonis* is a high prevalent bacteria and a member of core microbiota considering that is found in 91.7% of healthy subjects [40] and might represent up to 38% of Bacteroidetes

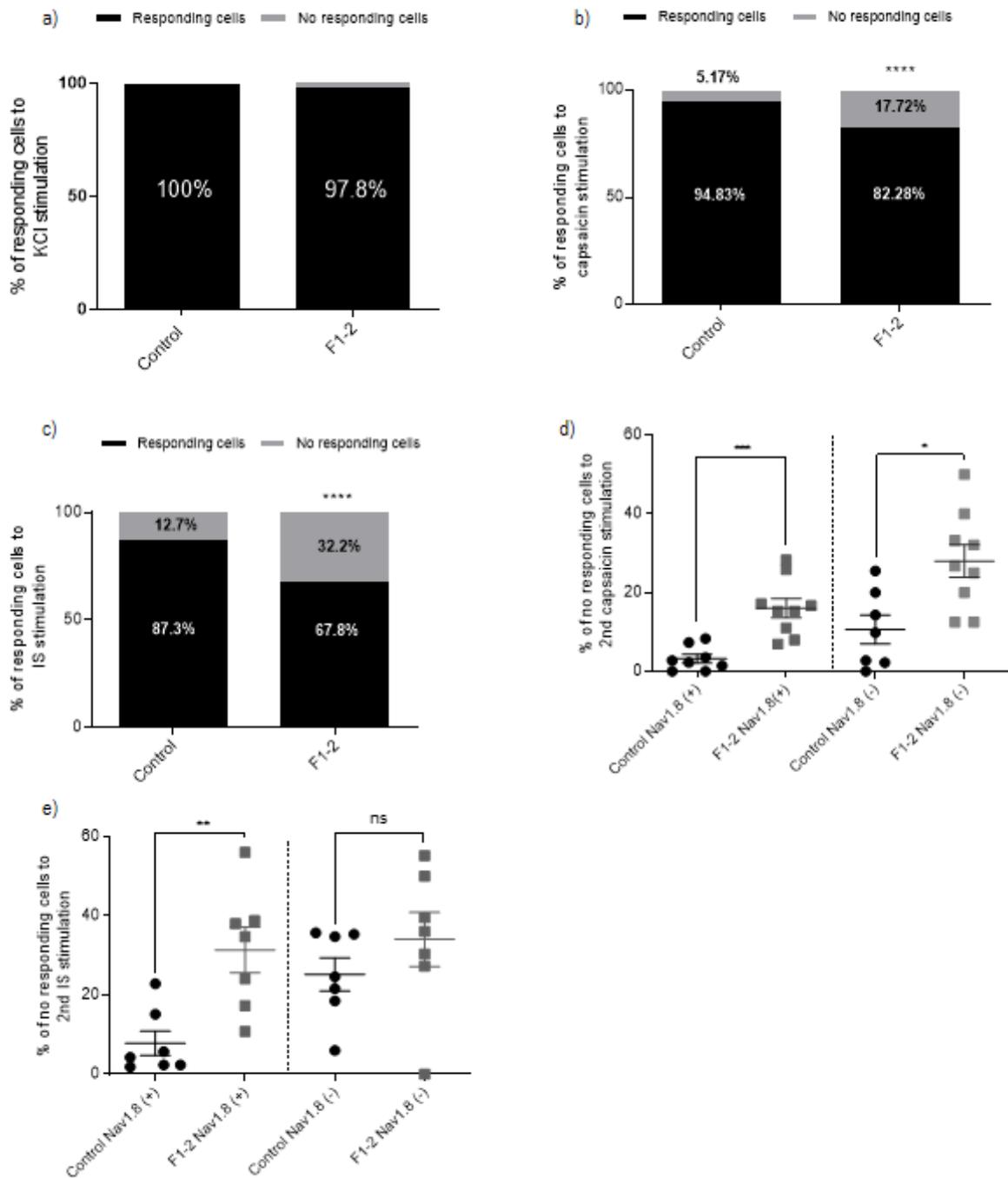


**Figure 6: Administration of *Parabacteroides distasonis* F1-2 did not reverse colonic hypersensitivity in NMS visceral pain mouse model.** *P. distasonis* F1-2 strain was tested in neonatal maternal separation visceral pain mouse model (NMS). Colonic hypersensitivity was assessed by colorectal distension (CRD) at the end experiment. (a) Visceromotor response to colorectal distension NMS mouse model: NMS-S + vehicle (n = 8) and NMS-S + F1-2 (n = 8) treated mice. (b) The area under curve (AUC) was calculated between 60 and 80mmHg for the different groups. (c) Intestinal permeability was assessed at D10 using FITC-dextran tracer, and compared to that of DSS mouse model. Mean  $\pm$  SEM.

present in the gut [41,42]. Because of its lowered abundance in diverse pathological contexts, and more particularly in IBD [36,38], this strain was thought to provide beneficial effects to the host [44] through probiotics properties that depends on bacterial strain [45,46]. Nevertheless deleterious effects were also associated with end-products fermentation of *P. distasonis* such as succinic acid production which acts as a pro-inflammatory signaling molecule in immune cells [47]. This discrepancy may be explained by differences between strains. For instance, no effect of the reference ATCC strain (ATCC®8503™) was observed on CHS in our study compared with the isolated strain. This paradoxical effect is consistent with variability observed between the species and described in the literature [21,46,48]. Among the 3 models of CHS used in our work, the isolated F1-2 strain reduced colonic sensitivity in DSS-induced CHS model associated with low-grade inflammation and in the post-infectious IBS model using *Citrobacter rodentium* but not in a neonatal stress model of maternal separation paradigm. Degree of intestinal permeability is certainly one of the parameters differentiating those three models. A “leaky gut” is a hallmark of DSS-induced CHS model and we previously demonstrated that intestinal barrier integrity is also altered both in infectious and post-infectious phases of this model [31]. Interestingly, no effect of F1-2 strain on CHS was observed in the NMS model for which we previously observed only a slight increase in colonic permeability, but much less than what is observed in the two previous models [32]. We hypothesized that, in a pathological context in which intestinal barrier is disrupted, bacteria-neurons direct contact may be facilitated and would participate to the anti-hyperalgesic characteristics of the F1-2 strain.

Trying to decipher beneficial effects of F1-2 strain, we further investigated its impact on intestinal permeability in the DSS-induced CHS model. *P. distasonis* F1-2 was not able to restore normal intestinal permeability compromised in this model. Only a few strains belonging to the species have been described for their ability to reinforce epithelial barrier, especially by increasing production of proteins involved in tight junction such as OCCLUDIN and ZO-1 in TNBS colitis induced mouse model [21,22,49].

The anti-hyperalgesic effect of *P. distasonis* F1-2 may involve different mechanisms at both peripheral and central levels. To further characterize these mechanisms, we evaluated the modulation of inflammatory parameters by F1-2 strain in the DSS-induced CHS model, characterized by a low-grade colonic inflammation induced by 0.5% DSS. As expected, Lcn-2, CXCL1 and IL-1 $\beta$  measurements revealed a low-grade inflammation development caused by DSS treatment, these results being in accordance with the literature [50]. While some *P. distasonis* strains have already demonstrated beneficial effect by reducing pro-inflammatory

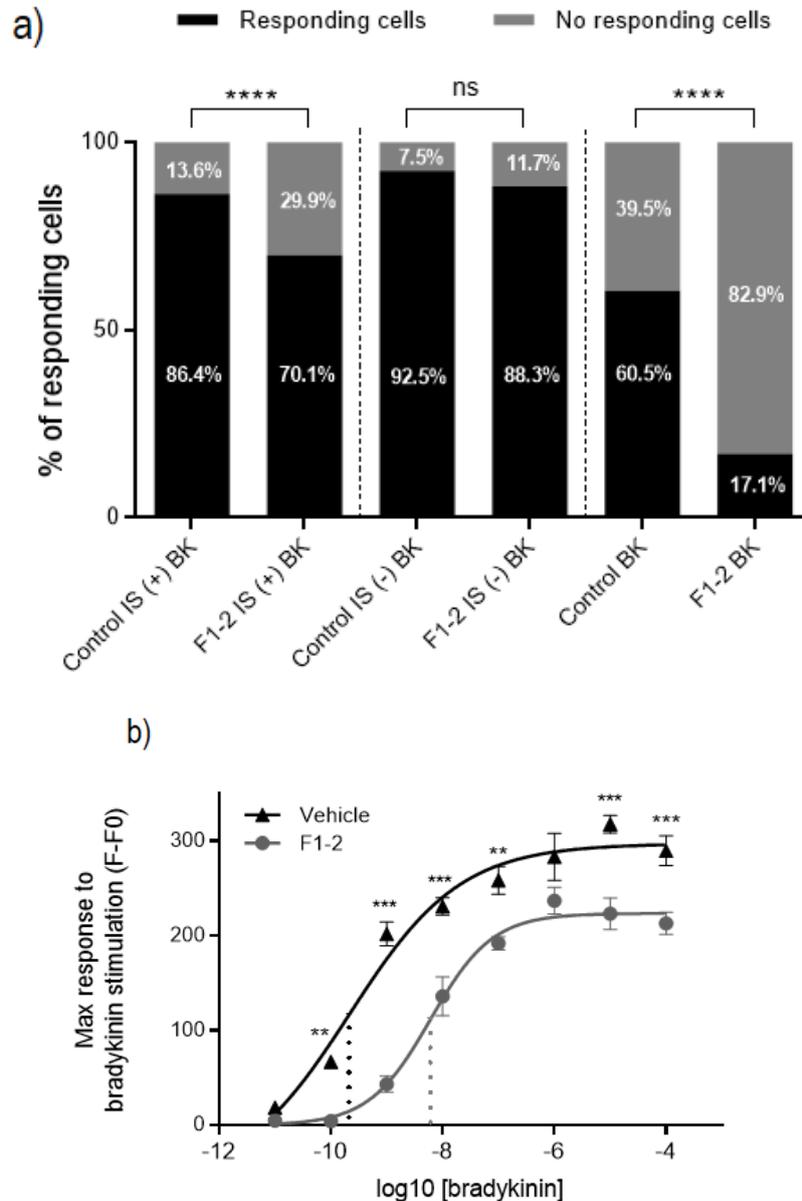


**Figure 7: *P. distasonis* F1-2 decreases nociceptors activation level.** Neuronal cells were stimulated a first time with KCl (30 mM), capsaicin (1  $\mu$ M) or IS before being incubated with Tyrode or *P. distasonis* F1-2. Neuronal cells were stimulated a second time with capsaicin or IS mixed with *P. distasonis* F1-2 before being lastly stimulated with KCl (50 mM). IS was composed by bradykinin, serotonin, histamine, PGE2 and KCl. % of sub population of neuronal cells activated by (a) KCl (30 mM), (b) capsaicin (1  $\mu$ M) or (c) IS in each condition. % of neuronal cells no responding to second (d) capsaicin or (e) IS stimulation, expressing or not Nav1.8 channel. IS: Inflammatory Soup; Nav1.8 (+): neuronal cells expressing Nav1.8 channel. Nav1.8 (-): neuronal cells no expressing Nav1.8 channel. Mean  $\pm$  SEM.

cytokines release *in vitro* [21] and in mice models of colitis and colorectal cancer [22,23] by reducing gene expression of IL-4 and TNF- $\alpha$  at colonic level [49], *P. distasonis* F1-2 did not modify inflammatory parameters in our study. Therefore, and contrary to many probiotics strains, these results pointed out anti-hyperalgesic potency of *P. distasonis* F1-2 despite the lack of marked inflammation.

In pathological disorders such as IBD or IBS, most of patients are diagnosed with various comorbidities including anxiety or depression. To study effect of F1-2 at central level, PI-IBS mouse model was used. The murine pathogen *C. rodentium* induces the development of CHS accompanied by anxiety-like behavior, even after pathogen clearance [31]. EPM test indicated that the *P. distasonis* F1-2 strain treatment did not reduce anxiety-like behavior induced in this PI-IBS model. In conclusion, F1-2 strain treatment has no impact on CHS-associated comorbidities although a modulation of the signal in central structures involved in the pain matrix by F1-2 strain cannot be ruled out and required further exploration.

To study the peripheral modulation of the pain signaling as a potential mechanism of the F1-2 strain anti-hyperalgesic action, we investigated neuronal activation in DRG neurons primary cultures after stimulation with several algogenic substances. *P. distasonis* F1-2 was able to desensitize a subset of DRG neurons stimulated with a high K<sup>+</sup> concentration solution, capsaicin or an inflammatory soup. This neuroinhibition was peculiarly marked in Nav1.8 expressing neurons since those cells were, as expected, more prompted to be activated by stimulation with capsaicin or inflammatory soup. However, a subset of Nav1.8 non expressing cells was also desensitized by F1-2 treatment after exposure to capsaicin suggesting that the effect of the strain is not restrained to nociceptors. The most potent inhibition induced by F1-2 strain was observed after bradykinin challenge. In this case, more than 43% of the cells were desensitized by F1-2 pre-incubation. Concomitantly, when inflammatory soup was deprived of bradykinin the inhibitory effect of F1-2 strain was lost. Therefore, an interaction between F1-2 strain and the bradykininergic system may constitute a possible mechanism of action involved in the anti-hyperalgesic effect of the strain and requires further investigation. Bradykinin is a well-documented pro-inflammatory mediator that excites and sensitizes nociceptors and finally evokes pain. Its contribution in visceral pain was previously reported both in rodents [51-53] and humans [54-56]. Interestingly, a cross-talk between bradykinin receptors and TRPV1 channels was previously reported in many studies demonstrating a sensitization of the channel following activation of bradykinin receptors [57]. On the other hand, blocking B2 *via* a receptor antagonist can abolish C-fiber responses, while blocking B1 had no effect [58]. Interestingly, response to capsaicin was also strongly reduced in nociceptors after F1-2 incubation [59].



**Figure 8: *P. distasonis* F1-2 decreases activation signal of neuronal cells stimulated with bradykinin.** a) Neuronal cells were stimulated a first time with IS (+) BK, IS (-) BK or BK before being incubated with Tyrode or *P. distasonis* F1-2. Neuronal cells were stimulated a second time with IS (+) BK, IS (-) BK or BK mixed with *P. distasonis* F1-2 before being lastly stimulated with KCl (50 mM). Activation signal observed by ratiometric calcium imaging with 2 neuronal sub populations stimulated twice with IS, IS deprived of bradykinin or bradykinin alone. First one corresponds to neuronal cells responding both to the first and the second stimulation (in black). The second corresponds to neuronal cells that responding only to the first stimulation (in grey).  $Ca^{2+}$  responses was measured on neuronal cells from DRG mice as normalized fluorescence 340nm/380nm ratios. % of sub population of neuronal cells activated by IS (+) bradykinin, IS (-) bradykinin or bradykinin in each condition. (b)  $Ca^{2+}$  activation signal of ND7/23 immortalized cells loaded with calcium probe (FLIPR Calcium 6 QF) stimulated with various doses of bradykinin ( $10^{-4}$  to  $10^{-11}$ M) after 45 min incubation with *P. distasonis* F1-2 or vehicle. Dose-response curve of bradykinin on ND7/23 cells expressing bradykinin receptor incubated with *P. distasonis* F1-2 or vehicle. Mean  $\pm$  SEM.

However, whether this effect relies on a direct interaction between the strain and TRPV1 channels or if this is a downstream effect through bradykinin receptors remains to be determined.

Molecular mechanisms by which F1-2 strain exerts its beneficial effect need to be explored. Bacterial cell components or metabolites such as polysaccharides [60,61], pili-like protein membrane [62], butyrate or long chain fatty acids [63] were previously identified as key molecules that confer anti-inflammatory properties of several intestinal commensal strains. In our study, despite no anti-inflammatory action was observed, identifying molecules stemming from F1-2 strain and that could interact with neurons, and more specifically with bradykinin receptors would be of great interest to characterize neuroinhibition mechanisms induced by this bacteria. Regarding regulatory limitations in Europe [64,65], there is a long way to integrate LPB as new treatment but *P. distasonis* F1-2 strain may constitute a potential novel therapeutic strategy to treat chronic abdominal pain observed in patients suffering from IBS or IBD in remission.

**CONFLICT OF INTEREST:** The authors have declared no conflicting interest.

**FUNDINGS:** This work was supported by co-financing GREENTECH SA (France) and by the Ministère de la Recherche et de la Technologie (NeuroDol laboratory (INSERM 1107)), but also by the Region Auvergne-Rhône-Alpes and FEDER, No. Thématiques émergentes and Pack Ambition Recherche; the French Government IDEX-ISITE Initiative, No. 16-IDEX-0001-CAP 20-25.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** GREENTECH Scientific team for their technical assistance, Julie BARBIER, Romane ARNOULD, Nicolas DUMAIRE and Maelle MONFREUX for their contribution. Abdelkrim Alloui (Animal Facilities) for animal care.

## REFERENCES

- [1] Kanazawa M, Hongo M, Fukudo S. Visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 119–121.
- [2] Zhou Q, Verne GN. New insights into visceral hypersensitivity—clinical implications in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 349–355.
- [3] Coates MD, Lahoti M, Binion DG, et al. Abdominal Pain in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 2207–2214.
- [4] Paine P. Review article: current and future treatment approaches for pain in IBS. *Aliment Pharmacol Ther* 2021; 54: S75–S88.
- [5] Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2010; 45: 571–583.

- [6] Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria: *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 564–571.
- [7] Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 13780–13785.
- [8] Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, et al. Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4136–4141.
- [9] Tap J, Derrien M, Törnblom H, et al. Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2017; 152: 111-123.e8.
- [10] Blake KJ, Baral P, Voisin T, et al. Staphylococcus aureus produces pain through pore-forming toxins and neuronal TRPV1 that is silenced by QX-314. *Nat Commun* 2018; 9: 37.
- [11] Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* 2013; 501: 52–57.
- [12] Defaye M, Gervason S, Altier C, et al. Microbiota: a novel regulator of pain. *J Neural Transm*. Epub ahead of print 24 September 2019. DOI: 10.1007/s00702-019-02083-z.
- [13] Deng L, Chiu IM. Microbes and pain. *PLoS Pathog* 2021; 17: e1009398.
- [14] Lagomarsino VN, Kostic AD, Chiu IM. Mechanisms of microbial–neuronal interactions in pain and nociception. *Neurobiol Pain* 2021; 9: 100056.
- [15] Lomax AE, Pradhananga S, Sessenwein JL, et al. Bacterial modulation of visceral sensation: mediators and mechanisms. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2019; 317: G363–G372.
- [16] Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low Counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in Colitis Microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 7.
- [17] Miquel S, Martín R, Lashermes A, et al. Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep* 2016; 6: 19399.
- [18] Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, et al. Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathway. *Front Microbiol*; 8. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00114.
- [19] Bian X, Wu W, Yang L, et al. Administration of *Akkermansia muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Front Microbiol* 2019; 10: 2259.
- [20] Zhang T, Ji X, Lu G, et al. The potential of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease. *Appl Microbiol Biotechnol*. Epub ahead of print 27 July 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11453-1.
- [21] Hiippala K, Kainulainen V, Suutarinen M, et al. Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing *Bacteroides* and *Parabacteroides* Spp. from A Healthy Fecal Donor. *Nutrients* 2020; 12: 935.

- [22] Cuffaro B, Assouhoun ALW, Boutillier D, et al. In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of Parabacteroides distasonis Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells* 2020; 9: 2104.
- [23] Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, et al. Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition: Bacterial components and experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2011; 163: 250–259.
- [24] Gibson PR. Use of the low-FODMAP diet in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2017; 32: 40–42.
- [25] Mańkowska-Wierzbicka D, Stelmach-Mardas M, Gabryel M, et al. The Effectiveness of Multi-Session FMT Treatment in Active Ulcerative Colitis Patients: A Pilot Study. *Biomedicines* 2020; 8: 268.
- [26] Coqueiro AY, Raizel R, Bonvini A, et al. Probiotics for inflammatory bowel diseases: a promising adjuvant treatment. *Int J Food Sci Nutr* 2019; 70: 20–29.
- [27] Dale HF, Rasmussen SH, Asiller ÖÖ, et al. Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients* 2019; 11: 2048.
- [28] Almeida D, Machado D, Andrade JC, et al. Evolving trends in next-generation probiotics: a SWIH perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020; 60: 1783–1796.
- [29] Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 12706–12711.
- [30] Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109–110.
- [31] Meynier M, Baudu E, Rolhion N, et al. AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes* 2022; 14: 2022997.
- [32] Mallaret G, Lashermes A, Meleine M, et al. Involvement of toll-like receptor 5 in mouse model of colonic hypersensitivity induced by neonatal maternal separation. *World J Gastroenterol* 2022; 28: 3903–3916.
- [33] Wood JN, Bevan SJ, Coote PR, et al. Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1990; 241: 187–194.
- [34] Kobrinsky EM, Pearson HA, Dolphin AC. Low- and high-voltage-activated calcium channel currents and their modulation in the dorsal root ganglion cell line ND7-23. *Neuroscience* 1994; 58: 539–552.
- [35] Haberberger RV, Barry C, Matusica D. Immortalized Dorsal Root Ganglion Neuron Cell Lines. *Front Cell Neurosci*; 14. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3389/fncel.2020.00184.
- [36] Martín R, Miquel S, Benevides L, et al. Functional Characterization of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of F. prausnitzii as a Next-Generation Probiotic. *Front Microbiol*; 8, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01226> (2017, accessed 16 August 2022).

- [37] Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, et al. Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* 2013; 501: 52–57.
- [38] Ferraz CCR, Henry MA, Hargreaves KM, et al. Lipopolysaccharide From *Porphyromonas gingivalis* Sensitizes Capsaicin-Sensitive Nociceptors. *J Endod* 2011; 37: 45–48.
- [39] Ruhl CR, Pasko BL, Khan HS, et al. Mycobacterium tuberculosis Sulfolipid-1 Activates Nociceptive Neurons and Induces Cough. *Cell* 2020; 181: 293-305.e11.
- [40] Almeida M. Caractérisation de flores microbiennes intestinale humaine et fromagère par méthode de métagénomique quantitative. 2013; 162.
- [41] Zitomersky NL, Atkinson BJ, Franklin SW, et al. Characterization of Adherent Bacteroidales from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* 2013; 8: e63686.
- [42] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59–65.
- [43] Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 2011; 11: 7.
- [44] Thirion F, Da Silva K, Plaza Oñate F, et al. Diet Supplementation with NUTRIOSE, a Resistant Dextrin, Increases the Abundance of *Parabacteroides distasonis* in the Human Gut. *Mol Nutr Food Res* 2022; 66: 2101091.
- [45] Ezeji JC, Sarikonda DK, Hopperton A, et al. *Parabacteroides distasonis*: intriguing aerotolerant gut anaerobe with emerging antimicrobial resistance and pathogenic and probiotic roles in human health. *Gut Microbes* 2021; 13: 1922241.
- [46] Chamarande J, Cunat L, Pavlov N, et al. *Parabacteroides distasonis* Properties Linked to the Selection of New Biotherapeutics. *Nutrients* 2022; 14: 4176.
- [47] Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 2013; 496: 238–242.
- [48] Zhu Y, Cai Y, Cao X, et al. Structural analysis and immunomodulatory activity of a homopolysaccharide isolated from *Parabacteroides distasonis*. *Arab J Chem* 2022; 15: 103755.
- [49] Koh GY, Kane AV, Wu X, et al. *Parabacteroides distasonis* attenuates tumorigenesis, modulates inflammatory markers and promotes intestinal barrier integrity in azoxymethane-treated A/J mice. *Carcinogenesis* 2020; 41: 909–917.
- [50] Chassaing B, Srinivasan G, Delgado MA, et al. Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLoS ONE* 2012; 7: e44328.
- [51] Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, et al. Effect of Icatibant, a Bradykinin B2 Receptor Antagonist, on the Development of Experimental Ulcerative Colitis in Mice. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 845–851.
- [52] Wang B, Yang A, Zhao Z, et al. The Plasma Kallikrein–Kininogen Pathway Is Critical in the Pathogenesis of Colitis in Mice. *Front Immunol* 2018; 9: 21.

- [53] Takemura Y, Furuta S, Hirayama S, et al. Upregulation of bradykinin receptors is implicated in the pain associated with caerulein-induced acute pancreatitis. *Synapse* 2011; 65: 608–616.
- [54] Jalanka J, Lam C, Bennett A, et al. Colonic Gene Expression and Fecal Microbiota in Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome: Increased Toll-like Receptor 4 but Minimal Inflammation and no Response to Mesalazine. *J Neurogastroenterol Motil* 2021; 27: 279–291.
- [55] Lin Z, Wang Y, Lin S, et al. Identification of potential biomarkers for abdominal pain in IBS patients by bioinformatics approach. *BMC Gastroenterol* 2021; 21: 48.
- [56] Stadnicki A, Pastucha E, Nowaczyk G, et al. Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G361-366.
- [57] Mathivanan S, Devesa I, Changeux J-P, et al. Bradykinin Induces TRPV1 Exocytotic Recruitment in Peptidergic Nociceptors. *Front Pharmacol* 2016; 7: 178.
- [58] Banik RK, Kozaki Y, Sato J, et al. B2 receptor-mediated enhanced bradykinin sensitivity of rat cutaneous C-fiber nociceptors during persistent inflammation. *J Neurophysiol* 2001; 86: 2727–2735.
- [59] Bernstein JA, Singh U, Haar L, et al. TRPV1 Ion Channel Activation Is Enhanced by Bradykinin in Sensory Neuronal Cells. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: AB135.
- [60] Mao Y-K, Kasper DL, Wang B, et al. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons. *Nat Commun* 2013; 4: 1465.
- [61] Rossi O, Khan MT, Schwarzer M, et al. Faecalibacterium prausnitzii Strain HTF-F and Its Extracellular Polymeric Matrix Attenuate Clinical Parameters in DSS-Induced Colitis. *PLOS ONE* 2015; 10: e0123013.
- [62] Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, et al. Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. *PLOS ONE* 2017; 12: e0173004.
- [63] Pujo J, Petitfils C, Faouder PL, et al. Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis. *Gut* 2021; 70: 1088–1097.
- [64] Cordaillat-Simmons M, Rouanet A, Pot B. Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework. *Exp Mol Med* 2020; 52: 1397–1406.
- [65] Cordaillat-Simmons M, Rouanet A, Pot B. Chapter 2 - Food or pharma: the name does make a difference. In: Dwivedi MK, Amaesan N, Sankaranarayanan A, et al. (eds) *Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases*. Academic Press, pp. 13–40.



---

## Données complémentaires

---

**Exploration du mécanisme moléculaire impliqué dans l'effet neuromodulateur entre *P. distasonis* F1-2 et les cellules neuronales**

-----

**Étude de l'innocuité de la souche *Parabacteroides distasonis* F1-2**

-----

**ANABIOTICS : Constitution d'une banque de souches commensales intestinales et évaluation de leurs propriétés neuromodulatrices**



## 1. Contexte de l'étude

La souche *Parabacteroides distasonis* F1-2 exerce un pouvoir antalgique marqué dans plusieurs modèles de douleur viscérale qui semble impliquer l'intervention d'une interaction avec les neurones (**Article 1**). En effet, les expériences menées *in vitro* ont permis de révéler le potentiel neuroinhibiteur de F1-2. Ce dialogue entre bactéries et neurones implique une interaction directe plus ou moins spécifique entre un/des composé(s) bactérien(s) associé(s) à la membrane et un/des récepteur(s) neuronaux. L'exploration des mécanismes moléculaires permettrait d'identifier le couple « ligand-récepteur » engagé dans cette interaction et pourrait mettre en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la douleur viscérale.

### *Axe 1 : À la recherche du composé bactérien actif...*

Comme quelques représentants du microbiote intestinal, *P. distasonis* est capable de synthétiser un certain nombre de neurotransmetteurs comme des catécholamines (dopamine et noradrénaline), la 5-HT, l'acétylcholine, l'histamine ou encore le GABA (Strandwitz, 2018). La synthèse du GABA est le résultat de la conversion du glutamate par la glutamate décarboxylase (GAD) dont l'espèce *P. distasonis* dispose (Otaru *et al.*, 2021). En plus de jouer un rôle au niveau central, le GABA et ses deux récepteurs, GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>, sont aussi présents à la périphérie et participent à la modulation de la douleur (Loeza-Alcocer *et al.*, 2019; Malcangio, 2018). Ils sont présents notamment au niveau viscéral (Brusberg *et al.*, 2009) faisant du GABA et de ses récepteurs des cibles thérapeutiques dans le traitement des douleurs abdominales. Le GABA est donc l'une des pistes envisagées afin d'expliquer l'effet neuroinhibiteur exercé par la souche de notre étude, *P. distasonis* F1-2, observé *in vitro* lors des expériences d'imagerie calcique (**Article 1**). Les protéases à sérine sont des enzymes produites majoritairement par les cellules épithéliales intestinales mais elles peuvent également être synthétisées par des espèces bactériennes du microbiote intestinal. Elles participent à la physiopathologie du SII et des MICI (Steck *et al.*, 2012). Comme décrit dans la **Revue bibliographique** de ce manuscrit, les récepteurs aux protéases à sérine sont multiples et leur activation peut contribuer à l'excitabilité neuronale ou bien au contraire, à leur désensibilisation. L'activation du récepteur PAR-4, par exemple, a permis de réduire l'HSVC en réponse à la DCR chez la souris (Augé *et al.*, 2009).



À l'image d'autres membres du microbiote intestinal comme *F. prausnitzii* par exemple, *P. distasonis* F1-2 pourrait moduler l'excitabilité de neurones de DRG de souris en produisant des protéases à sérine (Sessenwein *et al.*, 2017).

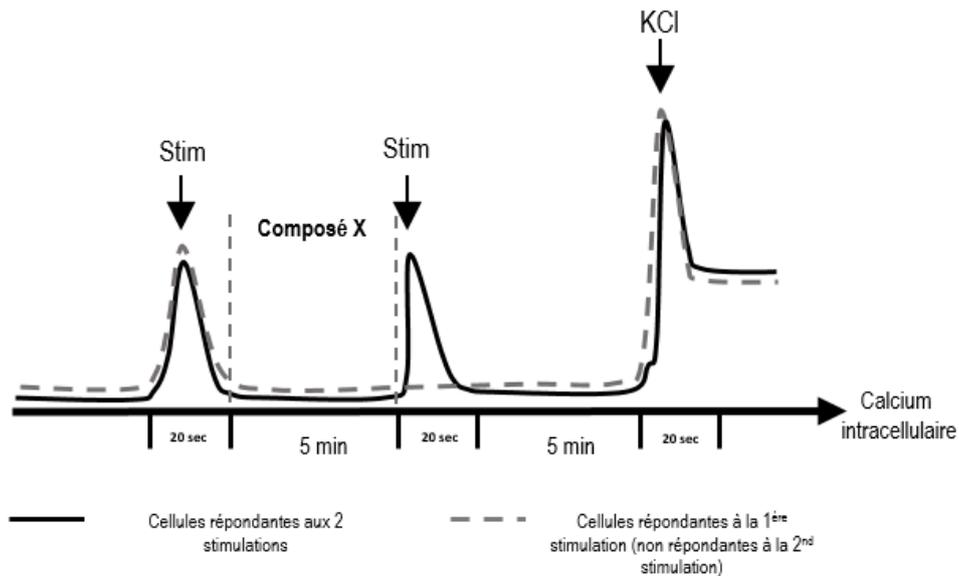
### ***Axe 2 : À la recherche du récepteur neuronal impliqué dans l'interaction bactérie-neurone...***

Dans le cas du SII ou des MICI, caractérisés par une HSVC, plusieurs médiateurs et récepteurs neuronaux contribuent au développement de douleurs abdominales chroniques. C'est notamment le cas des médiateurs de l'inflammation comme la 5-HT, l'histamine, la bradykinine, la SP, l'ATP, les prostaglandines ainsi que les cytokines et les chimiokines (Sadeghi *et al.*, 2018). Parmi l'ensemble des récepteurs identifiés, le canal TRPV1 est devenu une cible thérapeutique potentielle puisque son expression a été retrouvée augmentée dans le cas de pathologies intestinales (Akbar *et al.*, 2008, 2010). C'est aussi le cas des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) comme les récepteurs de la bradykinine, de la 5-HT ou de l'histamine (Gottesman-Katz *et al.*, 2021). Une expérience avait permis de révéler l'effet neuroinhibiteur de F1-2 sur des neurones de DRG de souris stimulés à la caspaïcine mais aussi à la soupe inflammatoire et de soupçonner l'implication de la bradykinine ou de ses récepteurs dans l'interaction bactéries-neurones (**Article 1**). Afin d'aller plus loin dans les aspects mécanistiques, plusieurs expériences complémentaires *in vitro* ont été réalisées.

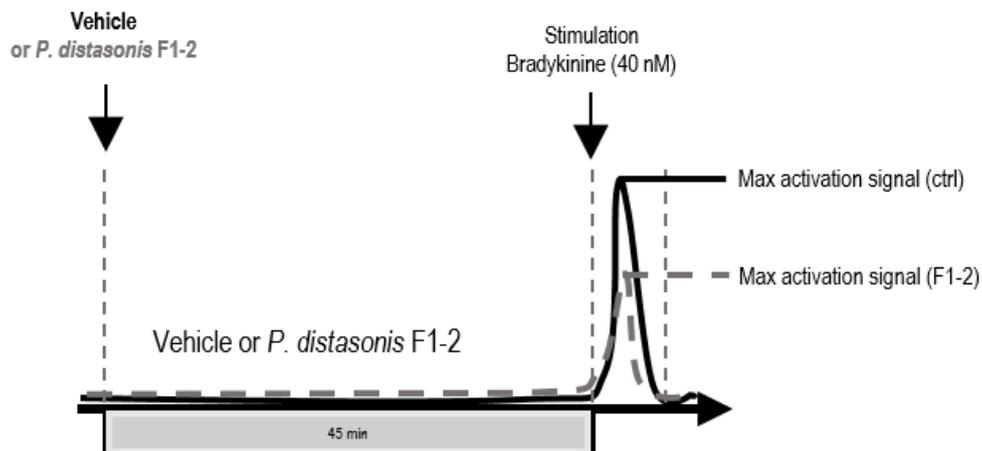
## **2. Matériel et méthodes**

**Dosages du GABA :** Après préculture de la souche F1-2 pendant 24h dans un milieu de culture adapté et décrit dans l'**Article 1**, celle-ci a été repiquée dans un milieu supplémenté de 1% (w/v) de glutamate. La souche F1-2 a été cultivée pendant 24h à 37°C en présence de ce substrat. Après avoir contrôlé la croissance bactérienne par mesure de densité optique à 595nm, les cultures ont été centrifugées et le GABA a été dosé dans les surnageants par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) au sein des laboratoires de la société GREENTECH.

**Dosage de l'activité protéasique :** Après une étape de préculture, la souche F1-2 a été cultivée pendant 24h dans un milieu adapté et décrit dans l'**Article 1**. Le dosage de l'activité protéasique a été réalisé dans le surnageant ainsi que dans la biomasse broyée en ajoutant le substrat correspondant (Suc-phe-ala-ala-pha-pNA, Bachem, à 100 µM).



**Figure 27 : Protocole de stimulation des neurones primaires de DRG de souris par imagerie calcique.** Composé X : GABA, antagonistes des récepteurs au GABA associés à la biomasse de F1-2 ou au véhicule, biomasse traitée aux inhibiteurs de protéases, biomasse inactivée par la chaleur.



**Figure 28 : Protocole de stimulation des cellules neuronales immortalisées ND7/23.** Cette expérience a été réalisée dans plusieurs conditions : en présence et en absence de calcium extracellulaire, et après blocage de la protéine G $\alpha$ i par la toxine pertussique (PTX).

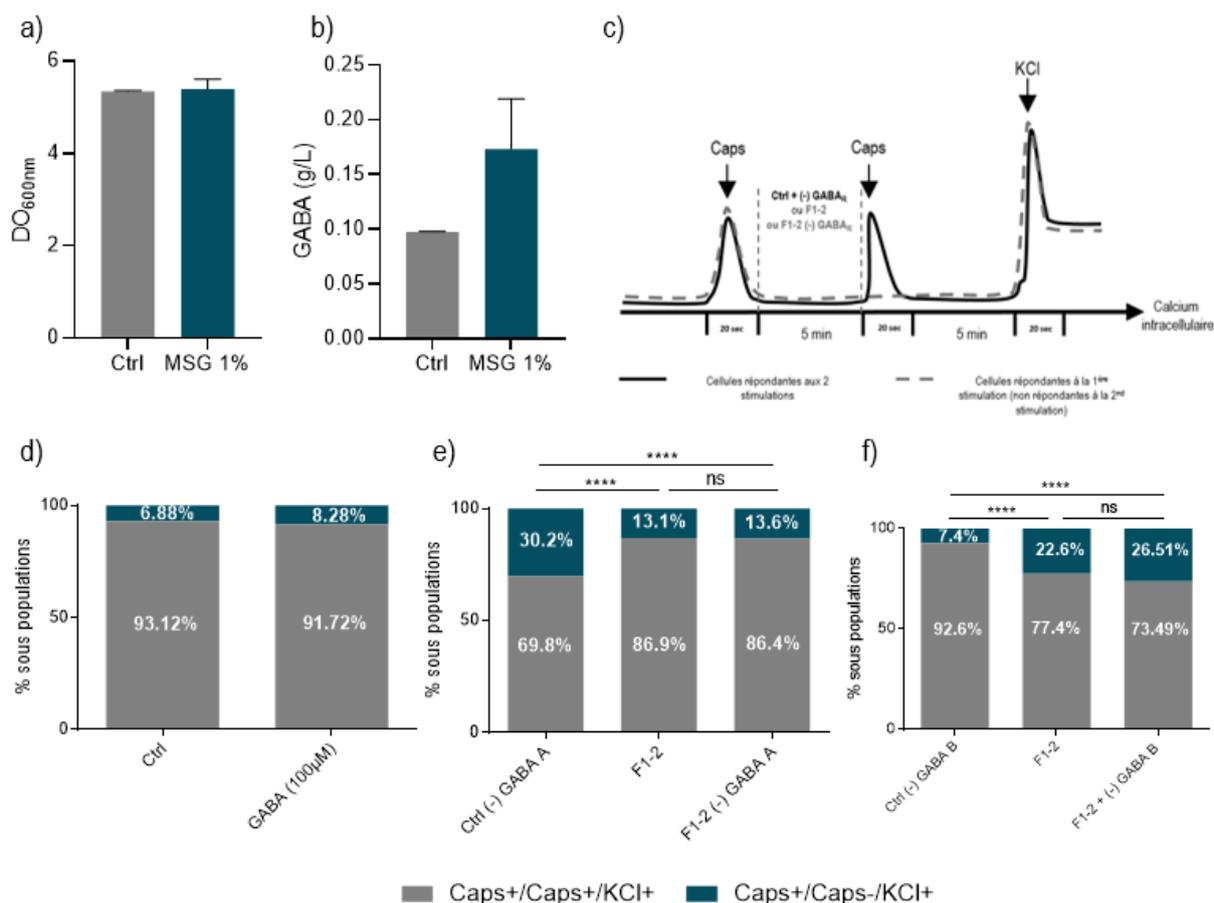
Le traitement de la biomasse consiste à reprendre les culots dans 1 mL de tampon tris HCl (50 mM + 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 8) + 200 mg de billes de verre (0.1 à 0.25 mm) avant de réaliser un broyage à l'aide d'un BeadBeater (2 min, 30/s). Les surnageants des broyats ont été récupérés pour être testés. Après 6h d'incubation à 37°C en présence du substrat, une coloration jaune apparaît, témoin d'une bonne réaction entre le substrat et les protéases à sérine. Cette réaction a été quantifiée par mesure de DO<sub>400nm</sub>.

**Culture primaire de neurones de DRG de souris et protocole de stimulation :** La culture primaire de neurones ainsi que le suivi de l'activation neuronale par imagerie calcique ont été réalisés en suivant le même protocole que celui décrit dans l'**Article 1 (Figure 27)**. Afin d'évaluer l'effet neuroinhibiteur du GABA, des neurones primaires de DRG de souris ont été stimulés avec une solution de capsaïcine (1 µM) avant d'être incubés pendant 5 min avec une solution de GABA (100 µM). Les cellules neuronales sont stimulées une 2<sup>nd</sup>e fois avec une solution de capsaïcine (1 µM) avant d'être rincées. Une stimulation finale au KCl (50 mM) est réalisée systématiquement en fin d'expérience afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Afin d'évaluer l'implication des récepteurs au GABA dans l'interaction bactéries-neurones, une expérience similaire a été réalisée, en bloquant alternativement les récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>, respectivement avec de la Bicuculline (100 µM) ou avec du CGP55845 (5 µM), des antagonistes spécifiques de ces deux récepteurs.

#### **Traitements de la biomasse de *P. distasonis* F1-2 :**

***Inactivation thermique de la biomasse :*** Afin de tester le caractère thermostable du/des composé(s) actif(s), la biomasse de la souche F1-2 a été chauffée à 100°C pendant 1h30 avant d'être testée pour son potentiel neuroinhibiteur sur des neurones primaires de DRG de souris par imagerie calcique (**Figure 27**).

***Inactivation des protéases contenues dans la biomasse :*** Pour évaluer la contribution des protéases à sérine dans le potentiel neuroinhibiteur de la souche F1-2, la biomasse de la souche a été traitée avec un inhibiteur de protéases (SIGMA P8465) inhibant les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les aminopeptidases et les protéases acides. Cet inhibiteur a été reconstitué en suivant les recommandations du fournisseur. Deux cents microlitres de la solution reconstituée ont été mélangés à 2 mL de biomasse de F1-2. Cette solution a été pré-incubée 2h à température ambiante puis congelée à -20°C avant d'être testée en imagerie calcique (**Figure 27**).



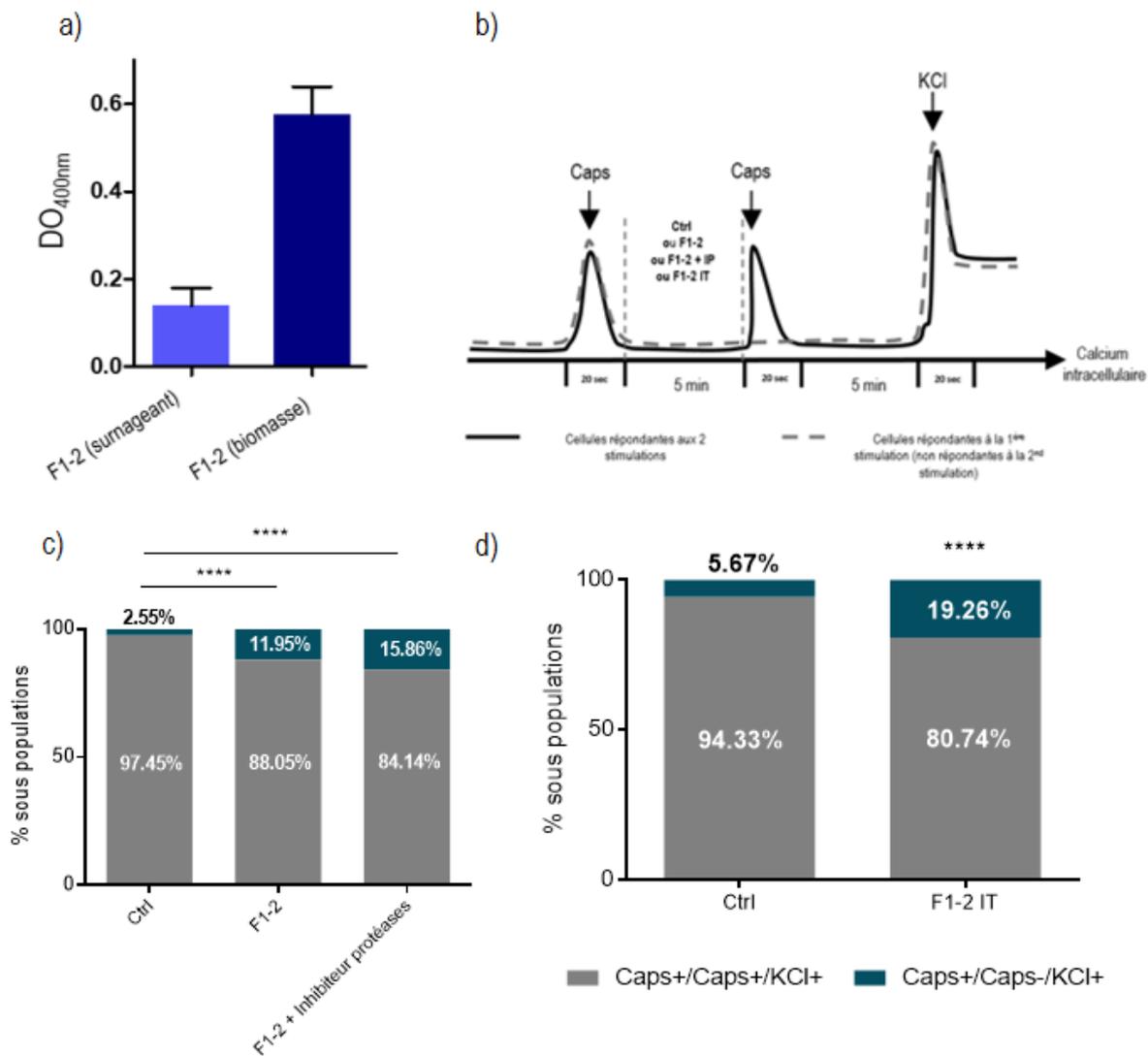
**Figure 29 : Le GABA produit par la souche ou ses récepteurs ne sont pas impliqués dans l'effet neuroinhibiteur observé *in vitro*.** (a) Croissance de F1-2 en présence de MSG-glutamate. (b) Synthèse de GABA par F1-2 en présence de 1% de MSG-glutamate. (c) Protocole. Les cellules neuronales sont stimulées une 1<sup>ère</sup> fois par de la capsaïcine (1 μM) avant d'être perfusées pendant 5 min avec le véhicule + antagoniste du récepteur GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub> ou bien avec F1-2 couplée ou non avec les antagonistes. Les cellules sont stimulées une 2<sup>nde</sup> fois avec de la capsaïcine (1 μM) puis rincées pendant 5 min. Enfin, une dernière stimulation au KCl (50 mM) est réalisée en fin d'expérience. (d) % de cellules répondantes et non répondantes à la 2<sup>nde</sup> stimulation appliquée en présence de GABA (100 μM) (n=3 à 4 dish/condition), (e) en présence de F1-2 et de l'antagoniste au récepteur GABA<sub>A</sub> (n=2 dish/condition) et (f) en présence de F1-2 et de l'antagoniste du récepteur GABA<sub>B</sub> (n=2 dish/condition). (-) GABA A : antagoniste du récepteur GABA<sub>A</sub> (Bicuculline) / (-) GABA B : antagoniste du récepteur GABA<sub>B</sub> (CGP55845) / Caps : Capsaïcine (1 μM) / MSG : MSG glutamate. Moyenne ± ESM. Analyse statistique : Test de Chi-2 : \*\*\*\*p<0.0001.

**Culture des cellules ND7/23 et protocole de stimulation :** La culture des cellules ND7/23 ainsi que l'activation neuronale suivie par flux calcique ont été réalisées en suivant le même protocole que celui décrit dans l'Article 1 (Figure 28). Afin d'identifier les flux calciques impactés par la souche F1-2, l'expérience a été réalisée en présence et en absence de calcium extracellulaire. Alors qu'en présence de calcium extracellulaire, le signal d'activation reflète les flux calciques intra et extracellulaires, en absence de calcium extracellulaire, le flux calcique mesuré se limite à la sortie du calcium du réticulum endoplasmique vers le compartiment cytoplasmique. Afin de tester l'implication de la protéine G $\alpha$ i dans l'interaction directe entre la souche F1-2 et les cellules neuronales, les cellules ND7/23 ont été cultivées avec ou sans toxine pertussique (PTX, 250 ng/mL, SIGMA) et incubées à 37°C pendant la nuit avant d'être utilisées (Figure 28).

### 3. Résultats et discussion

#### *Axe 1 : À la recherche du composé bactérien actif...*

Afin d'évaluer la contribution du GABA dans l'effet neuroinhibiteur de *P. distasonis* F1-2, la capacité de F1-2 à convertir le glutamate en GABA a été évaluée *in vitro*, mais a aussi été dosée dans la biomasse utilisée en imagerie calcique. Les résultats de dosage HPLC indiquent que F1-2 est capable de convertir le glutamate en GABA. La présence de GABA a également été confirmée par dosage, dans la biomasse de F1-2 utilisée pour les expériences d'imagerie calcique (Figures 29a et 29b). Appliqué sur des cellules neuronales issues de DRG de souris, le GABA ne permet pas d'augmenter significativement le % de neurones non répondants à une seconde stimulation à la capsaïcine (Figure 29d). Ce résultat suggère que, dans les conditions expérimentales choisies, le GABA n'est pas responsable de l'effet neuroinhibiteur exercé par F1-2. Certaines bactéries étant capables de produire des ligands autres que du GABA et de moduler le processus douloureux comme c'est le cas pour *Escherichia coli* Nissle 1917 (Pérez-Berezo *et al.*, 2017), l'hypothèse d'une possible activation des récepteurs au GABA par la souche F1-2 a été testée en bloquant alternativement le récepteur GABA<sub>A</sub> puis le GABA<sub>B</sub> avec des antagonistes spécifiques. Les résultats obtenus indiquent que le blocage de chacun de ces 2 récepteurs n'induit pas de perte d'activité de F1-2 et permettent d'écarter l'implication du GABA ou d'une interaction avec ses récepteurs dans le potentiel neuroinhibiteur de F1-2 (Figures 29e et 29f). Néanmoins, ces récepteurs ont été bloqués séparément. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet d'un blocage simultané des deux récepteurs du GABA. ☐



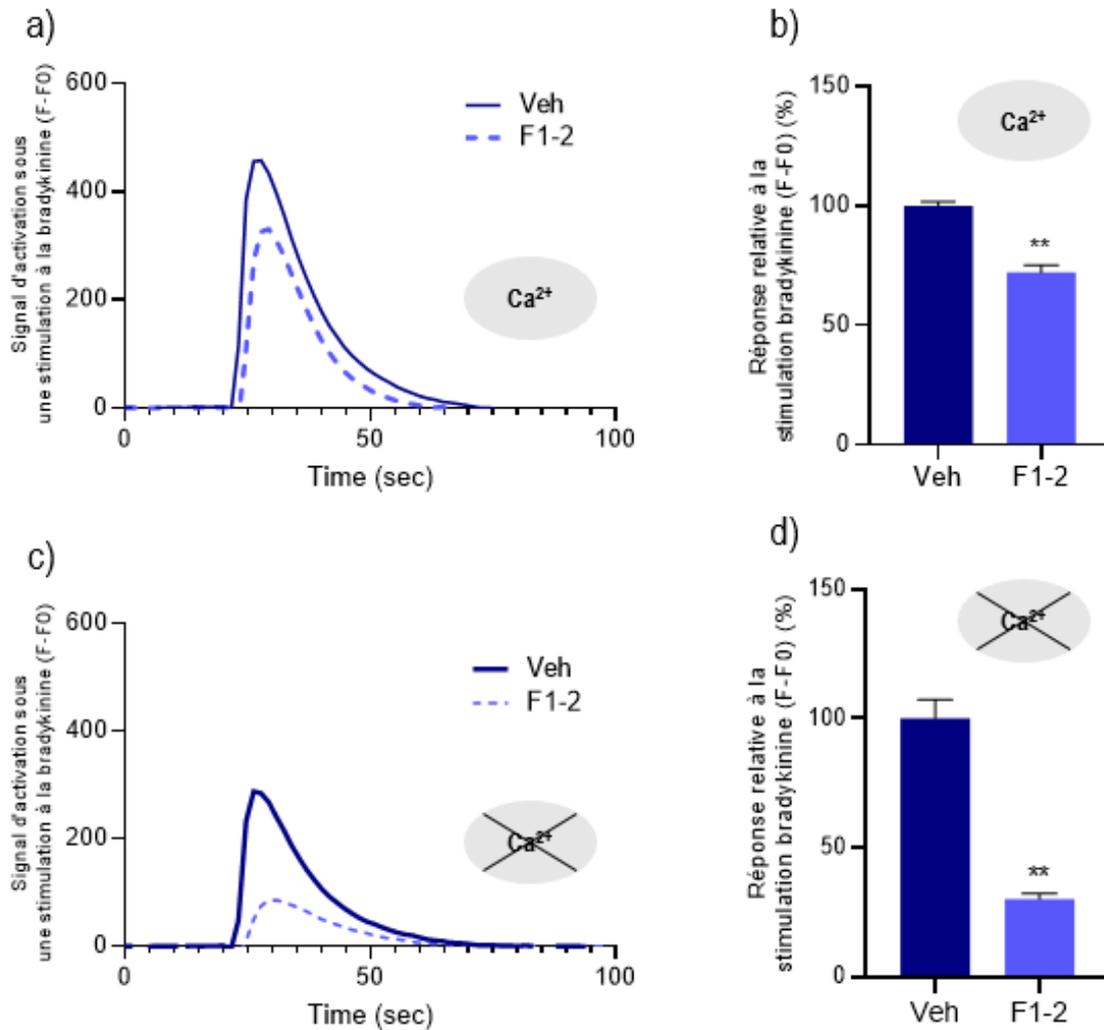
**Figure 30 : Les protéases à sérine sécrétées par *P. distasonis* F1-2 ne sont pas à l'origine de son effet neuroinhibiteur.** (a) Dosage de l'activité des protéases à sérine associées à la biomasse ou sécrétées dans son milieu extracellulaire. (b) Protocole. Les cellules neuronales sont stimulées une 1<sup>ère</sup> fois par de la capsaïcine (1  $\mu$ M) avant d'être perfusées pendant 5 min avec le véhicule, la souche F1-2, la souche F1-2 traitée aux inhibiteurs de protéases ou bien inactivée thermiquement. Les cellules sont stimulées une 2<sup>nd</sup>e fois avec de la capsaïcine (1  $\mu$ M) puis rincées pendant 5 min. Enfin, une dernière stimulation au KCl (50 mM) est réalisée en fin d'expérience. (c) % de cellules répondantes et non répondantes à la 2<sup>nd</sup>e stimulation appliquée après traitement de la biomasse de F1-2 aux inhibiteurs de protéases (n=2 à 3 dish/condition), (c) ou après inactivation thermique (n=3 dish/condition) (IT). *IT* : *Inactivation thermique*. Moyenne  $\pm$  ESM. Analyse statistique : Test de Chi-2 : \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Le dosage de l'activité protéasique révèle la présence de protéases à sérine dans le surnageant de F1-2 mais également associées à la biomasse utilisée en imagerie calcique (**Figure 30a**). La neutralisation de cette activité par un traitement de la biomasse aux inhibiteurs de protéases n'a pas permis d'annuler l'effet neuroinhibiteur exercé par la souche F1-2 (**Figure 30b, 30c**). De plus, l'effet neuroinhibiteur semble être porté par un composé thermostable puisqu'une inactivation thermique ne permet pas non plus d'annuler cet effet (**Figure 30d**) renforçant l'idée que les protéases à sérine ne sont pas impliquées dans l'effet de F1-2. Ces premières données sont très intéressantes puisque l'implication du GABA et des protéases à sérine dans la neuromodulation par le microbiote intestinal a été démontrée (Jimenez-Vargas *et al.*, 2018; Loeza-Alcocer *et al.*, 2019; Sessenwein *et al.*, 2017) et pourrait, dans certains cas, contribuer à réduire la douleur viscérale (Decraecker *et al.*, 2022; Laroute *et al.*, 2022; Pokusaeva *et al.*, 2017) ce qui n'est pas le cas de notre souche F1-2.

***Axe 2 : À la recherche du récepteur neuronal impliqué dans l'interaction bactérie-neurone...***

Les premiers résultats obtenus suggéraient l'implication de la bradykinine ou de ses récepteurs dans l'interaction bactéries-neurones (**Article 1**). Alors que l'identification du récepteur neuronal impliqué dans une interaction est facilitée par l'utilisation d'antagonistes dans le cas d'une activité neurostimulatrice, celle-ci se révèle beaucoup plus ardue dans le cas d'une activité neuroinhibitrice. En effet, dans notre cas de figure, il n'est pas possible d'utiliser des antagonistes puisqu'ils ont le même effet que l'inhibition. C'est pour cette raison que ces travaux complémentaires visent à explorer les voies de signalisation engagées dans cette interaction.

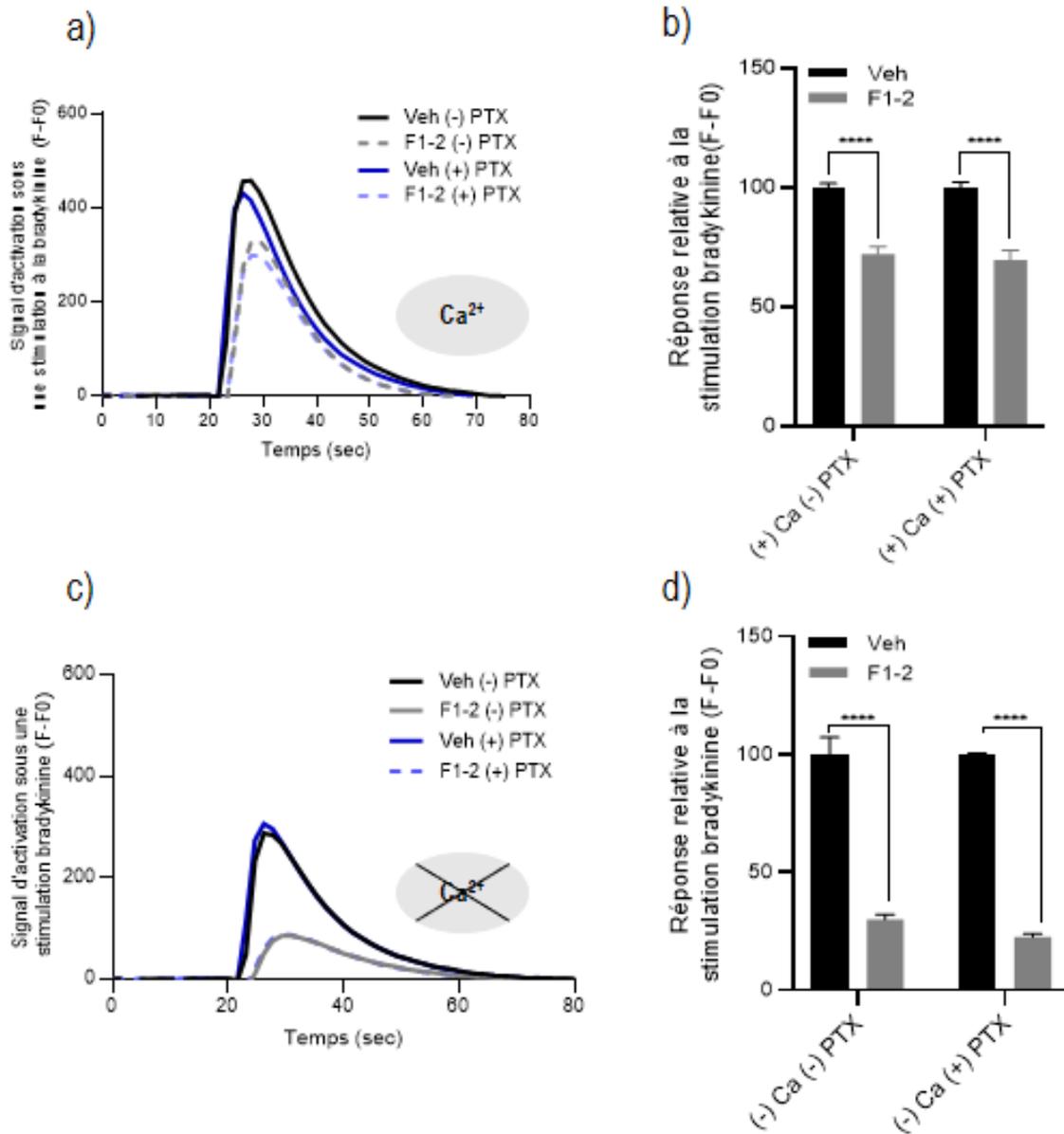
Une expérience complémentaire a été réalisée en stimulant des cellules ND7/23 avec de la bradykinine en présence ou en absence de calcium extracellulaire. En présence de calcium extracellulaire, le signal d'activation observé est le résultat d'une entrée de calcium provenant du réticulum endoplasmique (flux intracellulaire) mais aussi de l'environnement extérieur de la cellule. En absence de calcium extracellulaire, le signal d'activation observé est le résultat des flux calciques intracellulaires uniquement. Les résultats indiquent que l'effet neuroinhibiteur de la souche F1-2 est retrouvé aussi bien en présence qu'en absence de calcium intracellulaire.



**Figure 31 : L'effet neuroinhibiteur de F1-2 cible les flux calciques intracellulaires.** (a) Signal d'activation neuronale de cellules ND7/23 stimulées à la bradykinine (40 nM) en présence de calcium extracellulaire. (b) Réponse neuronale relative en présence de calcium extracellulaire. (c) Signal d'activation neuronale de cellules ND7/23 stimulées à la bradykinine (40 nM) en absence de calcium extracellulaire. (d) Réponse neuronale relative en absence de calcium extracellulaire. Veh : véhicule / F1-2 : *P. distasonis* F1-2. Analyse statistique : Test de Mann Whitney. b)  $**p = 0.0022$ . d)  $**p = 0.0022$ .

L'effet neuroinhibiteur de la souche F1-2 pourrait être majoritairement attribué au blocage des flux calciques intracellulaires puisque l'effet semble aussi marqué dans les 2 conditions testées (**Figure 31**). Ce résultat est très intéressant puisqu'il est connu que, parmi les voies cellulaires engagées dans la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), parmi lesquels les récepteurs à la bradykinine font partie, peut être à l'origine de ces flux.

Dans le cas des récepteurs de la bradykinine, plusieurs protéines G peuvent être impliquées comme la *G $\alpha$ i* ou la *G $\alpha$ q*. Alors que l'activation d'un RCPG couplé à une protéine *G $\alpha$ i* conduit à l'inhibition de l'adénylate cyclase et des flux calciques intracellulaires, l'activation d'un RCPG couplé à une protéine *G $\alpha$ q* conduit au contraire à la mobilisation des flux calciques intracellulaires. Une première expérience devait permettre de tester l'implication d'une protéine *G $\alpha$ i* dans l'interaction bactérie-neurone en la bloquant avec de la toxine pertussique. Les résultats indiquent que la souche F1-2 ne modifie pas le signal d'activation que les cellules soient traitées ou non à la PTX, en présence ou en absence de calcium extracellulaire (**Figure 32**). En effet, la souche F1-2 exerce toujours son effet neuroinhibiteur en réduisant significativement le signal d'activation (**Figures 32**). Ces résultats suggèrent que l'effet neuroinhibiteur de F1-2 ne passe pas par l'activation d'un RCPG couplé à une *G $\alpha$ i*, puisqu'elle était bloquée par la PTX dans cette expérience. Les récepteurs à la bradykinine peuvent aussi recruter une *G $\alpha$ s*, dont l'activation conduit à l'activation neuronale. Afin de tester l'éventuelle implication de la *G $\alpha$ s* dans cette interaction, un dosage de l'AMP cyclique pourrait être réalisé dans des conditions similaires à celles utilisées précédemment. Un dosage de l'AMP cyclique cellulaire en fin d'expérience permettrait d'accéder au niveau d'activation de cette voie.



**Figure 32 : L'effet neuroinhibiteur de F1-2 ne passe pas par l'activation d'un RCPG couplé à une *G $\alpha$ i*.** (a) Signal d'activation neuronale de cellules ND7/23 prétraitées, ou non, une nuit à la toxine pertussique (PTX), stimulées à la bradykinine (40 nM) en présence de calcium extracellulaire. (b) Réponse neuronale relative en présence de calcium extracellulaire. (c) Signal d'activation neuronale de cellules ND7/23 prétraitées ou non une nuit à la toxine PTX, stimulées à la bradykinine (40 nM) en absence de calcium extracellulaire. (d) Réponse neuronale relative en absence de calcium extracellulaire. *Veh* : véhicule / *PTX* : Toxine pertussique. Moyenne  $\pm$  ESM ( $n=6$  puits/condition). Analyse statistique : ANOVA 2 voies suivie d'un test de comparaison multiple de Sidak. \*\*\*\* $p<0.0001$ .

#### 4. Discussion générale

Ces expériences ont permis d'explorer différents aspects de l'interaction directe entre la souche *P. distasonis* F1-2 et les neurones. L'implication de certains métabolites bactériens comme le GABA ou les protéases à sérine a été écartée. En revanche, la bradykinine et ses récepteurs constituent une piste d'investigation très intéressante. Bien que plusieurs hypothèses aient été testées, cette approche ciblée n'a pas permis d'identifier le/les composé(s) engagé(s) dans l'interaction bactérie-neurone. Comme explicité dans la **Revue bibliographique** de ce manuscrit, les interactions entre bactéries et neurones sont multiples et complexes et les effets observés impliquent certainement plusieurs voies moléculaires. Cette complexité nécessite d'adopter une approche plus globale afin d'explorer les voies de signalisation cellulaires. L'exploration du transcriptome par RNAseq pourrait être envisagée puisqu'elle permettrait d'accéder aux activités cellulaires, à un instant donné. Cette technique permettrait d'évaluer le potentiel modulateur de *P. distasonis* F1-2 sur les voies cellulaires en lien avec l'activation neuronale.



## 1. Contexte de l'étude

Le microbiote intestinal est une population complexe de microorganismes participant au maintien de la santé de l'hôte. Son déséquilibre, appelé dysbiose, peut être associé à des pathologies. Parmi les probiotiques actuellement sur le marché, rares sont ceux ayant obtenu le statut de médicament. Pourtant, certaines souches bactériennes présentent des effets thérapeutiques et pourraient constituer une nouvelle classe de médicaments microbiotiques aussi appelés « Live Biotherapeutic Product » (LBP). C'est notamment le cas de *Faecalibacterium prausnitzii* ou encore de *Akkermansia muciniphila* qui font aujourd'hui l'objet d'essais cliniques. Actuellement, les directives réglementaires ne sont pas adaptées aux LBP (Cordaillat-Simmons *et al.*, 2020, 2022). De plus, les règles à respecter en vue d'obtenir une autorisation de mise sur le marché sont beaucoup plus strictes pour une application thérapeutique que pour les compléments alimentaires puisqu'ils sont soumis aux législations appliquées aux nouveaux médicaments (Cordaillat-Simmons *et al.*, 2020, 2022). Aujourd'hui, la communauté scientifique doit faire preuve d'adaptation en proposant des méthodes alternatives afin de démontrer la qualité, l'efficacité et la sécurité de cette nouvelle classe de médicaments en s'appuyant sur la réglementation en vigueur.

La souche *Parabacteroides distasonis* F1-2, préalablement isolée d'un donneur sain, a démontré son effet anti-hyperalgique chez la souris (**Article 1**). Le développement d'antibiorésistances multiples par certaines souches appartenant à l'espèce a été largement documentée et pourrait constituer un frein pour son utilisation chez l'Homme (Boente *et al.*, 2010; Kierzkowska *et al.*, 2020; Nakano *et al.*, 2011; Snyderman *et al.*, 2017). En effet, ces dernières élèvent le risque de dissémination de gènes de résistance à d'autres espèces et limitent aussi le contrôle de la prolifération de la souche bactérienne. Afin d'envisager son utilisation en tant de LBP dans le traitement des douleurs abdominales chroniques, la caractérisation de son profil d'antibiorésistance a été réalisée.

Enfin, afin d'étudier son innocuité, nous avons décidé d'adopter la même approche que celle utilisée récemment par Tan *et al.*, (2020). Dans cette étude, le modèle utilisé consiste à immunodéprimer des souris par l'injection de cyclophosphamide (CTX), un composé qui, en plus de perturber l'immunité, induit des cystites hémorragiques chez la souris (Boudieu *et al.*, 2019; Matz and Hsieh, 2017).



Des analyses macroscopiques, hépatiques et hématologiques ont été réalisées afin d'évaluer l'impact de la souche *P. distasonis* F1-2 chez des souris affaiblies par le traitement CTX.

## 2. Matériel et méthodes

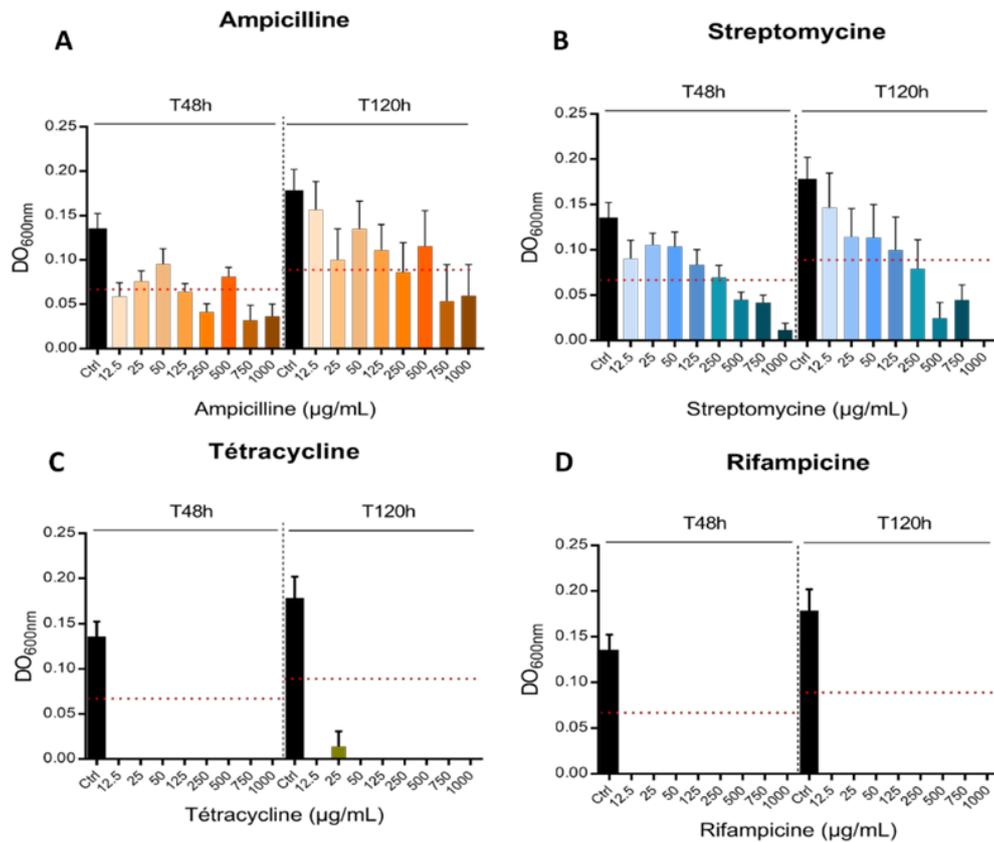
**Antibiogrammes :** 8 antibiotiques présentant des mécanismes d'action différents ont été utilisés afin d'identifier le profil d'antibiorésistance de la souche F1-2 : l'ampicilline, la rifampicine, le chloramphenicol, la tétracycline, l'érythromycine, la gentamycine, la streptomycine et la kanamycine. 200  $\mu\text{L}$  d'une suspension bactérienne de F1-2 ( $5.66 \times 10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup>) ont été étalés sur une gélose Blood Brain Agar (BBA) de façon homogène. Des disques imprégnés correspondants aux 8 antibiotiques testés ont été déposés sur les géloses. Après une incubation de 96h à 37°C en condition strictement anaérobie, les diamètres d'inhibition ont été mesurés. Afin de confirmer et d'affiner ces résultats préliminaires, un antibiogramme en bouillon a été réalisé pour 4 des 8 antibiotiques préalablement sélectionnés, à savoir, l'ampicilline, la tétracycline, la streptomycine et la rifampicine. Pour cela, chacun des antibiotiques a été testé à 8 concentrations différentes (allant de 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  à 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dans des microplaques 96 puits. L'inoculation des plaques a été réalisée en déposant 10% (v/v) d'une préculture de F1-2 de 24h dans chacun des puits correspondants ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.1$ ). Une lecture de la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  a été réalisée au bout de 48h et de 120h d'incubation à 37°C en condition strictement anaérobie. Chaque condition a été répliquée (n=6/condition).

**Modèle murin de souris immunodéprimées :** L'expérimentation a été réalisée sur 4 groupes de 10 souris C57Bl/6 mâles âgées de 7 semaines. L'effet de F1-2 a été évalué chez des souris contrôles ainsi que chez des souris immunodéprimées. L'immunosuppression a été induite par l'injection intrapéritonéale (IP) unique de CTX (250 mg/kg) 3 jours avant le début des gavages. Chaque souris a reçu quotidiennement 200  $\mu\text{L}$  de la souche F1-2 ( $1,245 \times 10^{10}$  CFU/mL) ou du véhicule (PBS + glycérol 20% (v/v)) correspondant, pendant 5 jours consécutifs. Les traitements sont les suivants : Ctrl + Veh (n=10), Ctrl + F1-2 (n=10), CTX + Veh (n=10) et CTX + F1-2 (n=10). Un suivi de poids a été réalisé pendant toute la durée de l'expérience. Après avoir été anesthésiées par injection IP de pentobarbital Euthasol® (100  $\mu\text{L}/\text{souris}$  de concentration 36,46 mg/L), les souris ont été sacrifiées à J8. Divers prélèvements ont été réalisés : sang, rate, foie, côlon et vessie.



Mode d'action de l'ATB		Nom de l'ATB	Zone d'inhibition (en cm)	Profil
Synthèse de la paroi		Ampicilline	0	Résistante
Synthèse protéique	Transcription	Rifampicine	> 4	Sensible
		Chloramphénicol	2,55	Sensible
	Traduction	Tétracycline	1,15	Sensible
		Erythromycine	0,8	Sensible
		Gentamycine	< 0,2	-
		Streptomycine	< 0,2	-
		Kanamycine	0	Résistante

**Figure 33 : Résultat des antibiogrammes sur géloses BBA après 96h d'incubation.** Les zones d'inhibition sont mesurées après 96h d'incubation.



**Figure 34 : Résultats des tests antibiogrammes en bouillon.** 4 antibiotiques ont été testés (A) ampicilline, (B) Streptomycine, (C) Tétracycline et (D) Rifampicine. La lecture de DO<sub>600nm</sub> a été réalisée au bout de 48h et de 120h d'incubation. Les résultats sont présentés en moyenne ± ESM. Chaque barre représente la moyenne de 6 réplicats.

**Étude des paramètres hématologiques et hépatiques :** Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque au moment du sacrifice. 500  $\mu$ L du sang récolté ont été déposés dans des tubes EDTA microméthodes puis analysés par frottis sanguin automatisé et par cytométrie en flux (XN 2000, Sysmex Technology). Un volume de sang inférieur à 300 $\mu$ L a été déposé dans des tubes héparine de lithium avec billes séparatrices. Ces derniers ont été centrifugés à 756 g pendant 15 minutes pour en extraire le sérum sur lequel une analyse de facteurs hépatiques a été réalisée par dosages enzymatiques spectrophotométriques (Automate VISTA, SIEMENS). Les analyses ont été réalisées par le laboratoire d'analyses biologiques du CHU Gabriel Montpied.

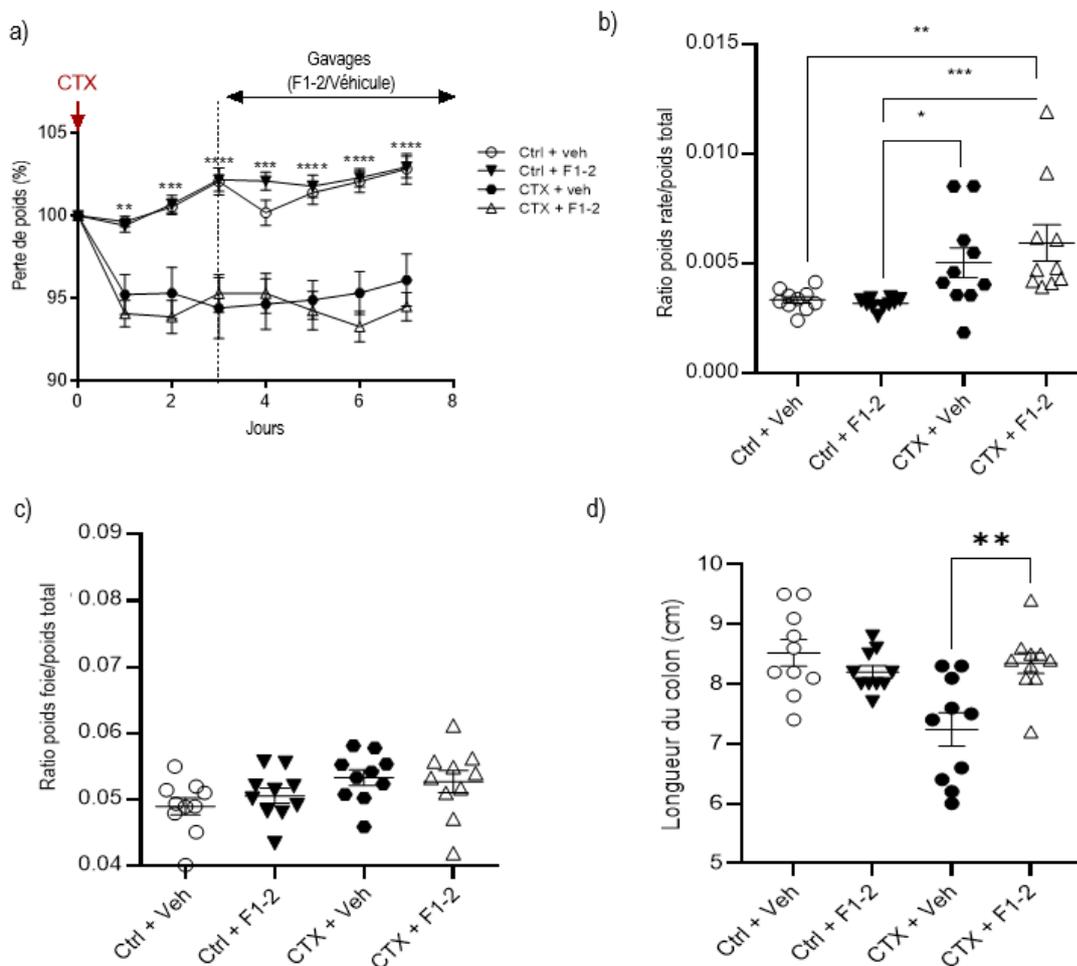
**Analyse macroscopique :** Le jour du sacrifice, la rate et le foie de chaque souris ont été prélevés et pesés. Un rapport du poids de la rate et du foie / poids total des animaux a été calculé pour chaque animal. Le côlon a été mesuré.

**Analyse histologique :** Au moment du sacrifice, les vessies ont été prélevées puis fixées dans du paraformaldéhyde (PFA 4%) pendant 48h. Le PFA a ensuite été retiré et remplacé par une solution de sucrose 30% (w/v) afin de cryoprotéger les tissus. L'inclusion a été réalisée dans une solution de Tissue Freezing Medium (TFM) dans des cassettes adaptées. Les vessies ont été conservées à -80°C avant d'être coupées au cryostat à -20°C (coupe de 10  $\mu$ m). Une coloration à l'hématoxyline-éosine a été réalisée afin de visualiser la structure histologique des vessies.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Analyse des risques d'une dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques

Comme mentionné précédemment, le développement de multirésistances au sein de l'espèce *P. distasonis* constitue aujourd'hui un frein à son utilisation en santé humaine. Les résultats des antibiogrammes sur gélose indiquent que la souche F1-2 est sensible au chloramphénicol (D=2.55cm), à l'érythromycine (D=0.8cm), à la rifampicine (D>4cm) et à la tétracycline (D=1.15cm). En revanche, elle semble résistante à l'ampicilline et à la kanamycine (D=0) (**Figure 33**). Les antibiogrammes réalisés en bouillon permettent de confirmer la sensibilité de F1-2 à la tétracycline et à la rifampicine, quelle que soit la concentration testée (**Figures 34C et 34D**) mais aussi sa résistance vis-à-vis de l'ampicilline et de la streptomycine (**Figures 34A et 34B**).



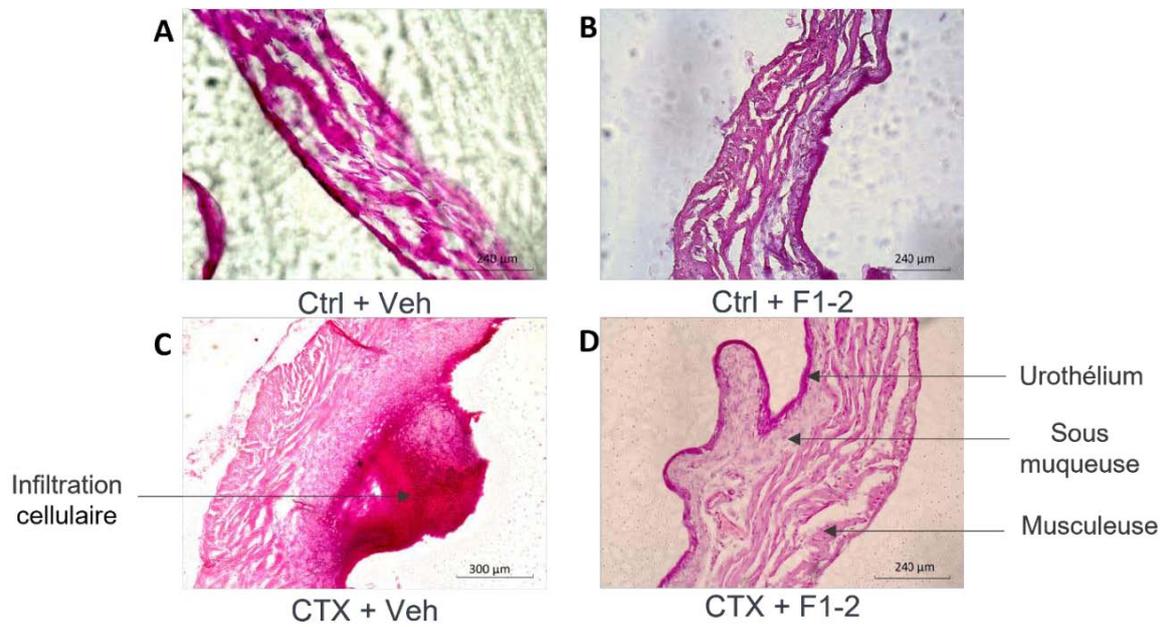
**Figure 35 : Impact de *P. distasonis* F1-2 sur la perte de poids et sur les organes chez des souris contrôles ou immunodéprimées.** (a) suivi du poids des animaux. (b) à la fin de l'expérience, la rate (b), le foie (c) ont été prélevés puis pesés afin de calculer un ratio pour chacun des organes. Le ratio calculé pour la rate et le foie correspond au poids de l'organe / le poids total de l'animal. (d) Le côlon de chacun des animaux a été mesuré. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. *Analyse statistique* : a) ANOVA 2 voies suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. Ctrl + veh vs. Ctrl + CTX : (D1) \*\* $p < 0.01$  / (D2) \*\*\* $p < 0.001$  / (D3) \*\*\*\* $p < 0,0001$  / (D4) \*\*\* $p < 0.001$  / (D5) \*\*\*\* $p < 0,0001$  / (D6) \*\*\*\* $p < 0,0001$  / (D7) \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Ctrl+veh vs. Ctrl+F1-2 : ns. CTX+veh vs. CTX+F1-2 : ns. b) Test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn. Ctrl + Veh vs. CTX + F1-2 : \*\* $p < 0.01$ . Ctrl+F1-2 vs. CTX+Veh : \* $p < 0,05$ . Ctrl+F1-2 vs. CTX+F1-2: \*\*\* $p < 0.001$ . c) ANOVA une voie: ns. d) ANOVA une voie suivi d'un test de comparaisons multiples de Tukey. CTX + Veh vs. CTX + F1-2 : \*\* $p < 0.01$ .

Néanmoins, une concentration comprise entre 500 et 750  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  d'ampicilline semble suffisante pour inhiber la croissance de la souche de 50% (**Figures 34A**). De même pour la streptomycine, une concentration comprise entre 250 et 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  inhibe de moitié la croissance de F1-2 (**Figure 34B**).

Préalablement à cette étude, le séquençage complet de la souche F1-2 avait révélé la présence de 2 gènes de résistance aux antibiotiques, *CfxA2* et *TetQ*, portés par le génome chromosomique. La résistance de la souche F1-2 à l'ampicilline semble cohérente avec la présence du gène *CfxA2* qui code une bêta-lactamase. En revanche, bien que le gène *TetQ* soit présent dans le génome de la bactérie, nos résultats indiquent que, dans les conditions expérimentales choisies, la souche F1-2 est sensible à la tétracycline. Il n'est pas exclu que la résistance apportée par le gène *TetQ* soit effective dans des conditions autres que celles appliquées dans notre expérience. Néanmoins, contrairement aux gènes plasmidiques, l'origine chromosomique de ce gène limite considérablement les phénomènes de transmissions de gènes à d'autres espèces bactériennes. Les résultats de notre étude indiquent que, contrairement à certaines souches appartenant à cette espèce (Nakano *et al.*, 2011), F1-2 semble sensible à la majorité des antibiotiques testés. Ces premiers résultats sont rassurants et des analyses complémentaires élargissant le spectre d'antibiotiques testés pourraient permettre d'envisager son utilisation en santé humaine.

### 3.2. Analyse de l'innocuité de la souche *P. distasonis* F1-2 dans un modèle de souris immunodéprimées

La toxicité de la souche F1-2 a été testée *in vivo*, en administrant une dose quotidienne de  $2.49 \times 10^9$  cellules bactériennes pendant 5 jours à des souris immunodéprimées par injection de CTX, 3 jours avant le début des gavages. De par ses propriétés immunosuppressives, le CTX est le traitement le plus utilisé dans le cas de leucémie, de myélomes multiples, de lymphomes ou de maladies auto-immunes. Ce modèle a d'ores et déjà été utilisé afin de démontrer l'innocuité de la souche *Bacteroides fragilis*, aux propriétés anti-inflammatoires (Mao *et al.*, 2013; Troy and Kasper, 2010) et qui est candidate en tant que probiotique de nouvelle génération (Tan *et al.*, 2020a). Alors que le CTX induit une perte de poids significative dans les 24h suivant l'injection (J1) ( $p < 0.001$ ) durable dans le temps, et en accord avec la littérature (Tan *et al.*, 2020), l'administration de la souche F1-2 ne présente aucun effet sur ce paramètre, que ce soit dans le groupe contrôle ou dans le groupe ayant reçu le traitement CTX (**Figure 35a**). En effet, dans cette expérience, le taux de survie est de 100% quel que soit le groupe considéré.



**Figure 36 : Observation microscopique de la paroi vésicale après coloration Hématoxyline-Eosine.** (A) groupe Ctrl + Veh ; (B) groupe Ctrl + F1-2 ; (C) groupe CTX + Veh ; (D) groupe CTX + F1-2.

La toxicité du CTX se traduit aussi par une augmentation significative du poids de la rate ( $p < 0.001$ ) (**Figure 35b**), mais ne semble pas modifier celui du foie (**Figure 35c**). Enfin, la longueur du côlon semble être réduite par le traitement CTX chez certains animaux (**Figure 35d**). L'administration de la souche F1-2 n'induit aucun changement significatif dans le groupe contrôle, quel que soit le paramètre étudié. En revanche, elle semble limiter l'impact du CTX sur la longueur du côlon ( $p < 0.001$ ) (**Figure 35d**).

Le CTX étant un modèle de cystite (Boudieu *et al.*, 2019), une observation microscopique des vessies a été réalisée après coloration à l'hématoxyline-éosine. L'observation de la structure des vessies révèle une infiltration de cellules immunitaires dans la paroi vésicale de certains animaux traités au CTX. Ce phénomène ne semble pas présent chez les animaux ayant reçu la souche F1-2. Cette infiltration cellulaire pourrait révéler la présence d'une inflammation qui devra être vérifiée par dosage de médiateurs inflammatoires par ELISA ou en utilisant la technologie LUMINEX (**Figure 36**).

L'analyse de la formulation sanguine indique une perturbation de l'érythropoïèse induite par le traitement CTX se traduisant par la présence de blastes mais aussi par une baisse significative du nombre d'érythrocytes, de l'hémoglobine et de l'hématocrite. De plus, la baisse du nombre de leucocytes et notamment de la population lymphocytaire chez les animaux du groupe CTX confirme l'efficacité du traitement immunosuppresseur. L'administration de la souche F1-2 n'altère ni n'aggrave ces différents paramètres (**Tableau 5**). Au niveau hépatique, et contrairement à ce que Tan *et al.* (2020) avaient observé, aucune modification n'a été constatée entre les différents groupes. Ces résultats préliminaires suggèrent que, dans les conditions expérimentales choisies, la souche F1-2 ne présenterait pas d'effets plus toxiques que ceux engendrés par le traitement immunosuppresseur (**Tableau 6**).

**Tableau 5 : Synthèse des valeurs de paramètres hématologiques chez les souris contrôles et immunodéprimées après 5 jours de traitement avec F1-2. Les données sont affichées avec leur moyenne  $\pm$  ESM.**

	Ctrl	F1-2	CTX + Veh	CTX + F1-2
LEUCO ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	3,43 $\pm$ 0,49	4,28 $\pm$ 0,28	1,76 $\pm$ 0,20 **	2,22 $\pm$ 0,18
Erythrocytes ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	8,77 $\pm$ 0,13	9,1 $\pm$ 0,15	7,07 $\pm$ 0,39 ****	6,74 $\pm$ 0,14
Hb (g.dL <sup>-1</sup> )	12,93 $\pm$ 0,14	13,25 $\pm$ 0,2	10,23 $\pm$ 0,53 ****	9,79 $\pm$ 0,18
Ht (%)	47,99 $\pm$ 0,53	49,66 $\pm$ 1,00	38,25 $\pm$ 2,15 ****	37,07 $\pm$ 0,71
VGM (fL)	54,75 $\pm$ 0,41	54,56 $\pm$ 0,35	54,41 $\pm$ 0,46	55,02 $\pm$ 0,66
TCMH (pg)	14,73 $\pm$ 0,10	14,56 $\pm$ 0,05	14,54 $\pm$ 0,1	14,52 $\pm$ 0,09
CCMH (g.dL <sup>-1</sup> )	26,95 $\pm$ 0,20	26,7 $\pm$ 0,23	26,7 $\pm$ 0,31	26,42 $\pm$ 0,28
IDR (%)	17,98 $\pm$ 0,18	17,95 $\pm$ 0,17	16,77 $\pm$ 0,28	17,03 $\pm$ 0,35
Thrombocytes ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	551,43 $\pm$ 26,47	544 $\pm$ 22,34	555,22 $\pm$ 46,31	592,6 $\pm$ 62,37
VPM (fL)	6,5 $\pm$ 0,12	6,3 $\pm$ 0,08	7,37 $\pm$ 0,20 **	7,23 $\pm$ 0,09
NEUT ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,21 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,04
LYMPH ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	2,83 $\pm$ 0,31	3,67 $\pm$ 0,19	1,23 $\pm$ 0,25 ***	1,48 $\pm$ 0,12
MONO ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,41 $\pm$ 0,19	0,27 $\pm$ 0,11	0,08 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,06
BASO ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,11 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,07	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01
Ig ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
NEUT (%)	6,51 $\pm$ 1,02	5,68 $\pm$ 0,74	20,86 $\pm$ 2,81 ****	12,23 $\pm$ 2,05 ##
LYMPH (%)	82,64 $\pm$ 3,79	86,69 $\pm$ 2,45	70,88 $\pm$ 4,44	72,93 $\pm$ 3,26
MONO (%)	9,02 $\pm$ 4,14	6,1 $\pm$ 2,08	5,59 $\pm$ 1,86	11,16 $\pm$ 2,74
BASO (%)	1,35 $\pm$ 0,30	1,53 $\pm$ 0,31	1,57 $\pm$ 0,36	1,34 $\pm$ 0,22
NEUT GI (SI)	124,7 $\pm$ 5,07	134,68 $\pm$ 3,52	108,06 $\pm$ 3,65	110,08 $\pm$ 4,96
NEUT RI (FI)	32,12 $\pm$ 0,42	31,98 $\pm$ 0,36	38,59 $\pm$ 2,32	41,09 $\pm$ 2,35
Blastes ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,01 **	0,11 $\pm$ 0,03
Blastes (/100 leuco)	0,16 $\pm$ 0,08	0,3 $\pm$ 0,07	3,32 $\pm$ 0,84 *	5,09 $\pm$ 1,24
RET (%)	3,18 $\pm$ 0,19	3,14 $\pm$ 0,19	4,29 $\pm$ 0,70	3,90 $\pm$ 0,47
RET ( $10^9 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	278,41 $\pm$ 16,94	286,22 $\pm$ 18,02	285,78 $\pm$ 34,64	240,03 $\pm$ 37,25

Abréviations: LEUCO, leucocytes ; Hb, hémoglobine; Ht, hématocrite ; VGM, volume globulaire moyen; TCMH, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; CCMH, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; IDR, indice de distribution des globules rouges; VPM, volume plaquettaire moyen ; NEUT, polynucléaires neutrophiles, LYMPH, lymphocytes; MONO, monocytes; BASO, polynucléaires basophiles; Ig, immunoglobulines; NEUT GI, intensité de granulation des polynucléaires neutrophiles ; NEUT RI, intensité de réactivité des polynucléaires neutrophiles ; blastes, cellules nucléées immatures érythrocytaires ; RET, réticulocytes. *Analyse statistique* : **Ctrl vs. CTX + Veh** : \* / LEUCO (\*\**p* value = 0,003), Erythrocytes (\*\*\*\**p* value < 0,0001), Hb (\*\*\*\**p* value < 0,0001), Ht (\*\*\*\**p* value < 0,0001), VPM (\*\**p* < 0,01), LYMPH (\*\**p* < 0,001), NEUT (\*\*\*\**p* value < 0,0001), Blastes (/100 leuco) (\**p* < 0,05). Blastes ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) (\*\**p* < 0,01). **CTX + Veh vs. CTX + F1-2** : #. / NEUT (%) : ##*p* < 0,01.

**Tableau 6 : Synthèse des valeurs des paramètres hépatiques chez les souris normales et immunodéprimées après 5 jours de traitement avec F1-2.** Les données sont affichées avec leur moyenne  $\pm$  ESM.

	Ctrl	F1-2	CTX + Veh	CTX + F1-2
TG (mmol.L <sup>-1</sup> )	1,21 $\pm$ 0,21	1,05 $\pm$ 0,07	1,12 $\pm$ 0,20	1,30 $\pm$ 0,09
PROT. (g.L <sup>-1</sup> )	52,54 $\pm$ 2,62	47,78 $\pm$ 1,48	47,51 $\pm$ 2,13	49,48 $\pm$ 2,15
Glu (mmol.L <sup>-1</sup> )	15,34 $\pm$ 1,65	14,24 $\pm$ 0,89	11,45 $\pm$ 0,83	12,3 $\pm$ 0,57
CT (mmol.L <sup>-1</sup> )	1,86 $\pm$ 0,08	1,85 $\pm$ 0,06	1,67 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,08
IH	6,6 $\pm$ 0,51	5,67 $\pm$ 0,44	5,8 $\pm$ 0,37	5,75 $\pm$ 0,53

Abréviations : TG, triglycérides ; PROT, protéines totales ; Glu, glucose ; CT, cholestérol ; IH, indice d'hémolyse. Analyse statistique : Ctrl vs. CTX + Veh : ns. CTX + Veh vs. CTX + F1-2 : ns.

#### 4. Discussion générale

La souche *P. distasonis* F1-2 ayant démontré des effets antalgiques en réduisant l'hypersensibilité viscérale d'origine colique chez la souris (**Article 1**), elle pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement des douleurs abdominales chroniques. La démonstration de son innocuité est une étape indispensable afin d'envisager son utilisation chez l'Homme et pourrait lui permettre de rejoindre la liste des probiotiques des LBP. Cette étude préliminaire visait à apporter les premières preuves de son innocuité. Les résultats obtenus ont révélé l'absence d'antibiorésistances multiples et l'absence de toxicité splénique, vésicale, hépatique et hématologique. Ces données préliminaires sont rassurantes et témoignent de l'innocuité de la souche *P. distasonis* F1-2.



# Constitution d'une banque de souches bactériennes commensales intestinales et évaluation de leurs propriétés neuromodulatrices

### 1. Contexte de l'étude

Comme évoqué dans le **Chapitre III** de la revue bibliographique de ce manuscrit, l'isolement et la purification de bactéries commensales intestinales est une étape critique du fait de leur extrême sensibilité à l'oxygène. Alors que les méthodes classiques utilisant une chambre anaérobie ainsi que des milieux adaptés à la culture de cette microflore particulière ne permettent d'accéder qu'à une partie de la diversité microbienne, des systèmes sont actuellement en développement et offrent la possibilité d'accéder à une diversité beaucoup plus étendue. L'équipe de Vincent Thomas, responsable de l'unité technologique collections biologiques et microbiologie au sein de l'institut **BIOASTER**, propose une méthode rapide et efficace permettant de détecter, de séparer, d'isoler et de cultiver la majorité des espèces bactériennes présentes dans un échantillon de selles humaines. Une collaboration récente entre l'institut **BIOASTER**, la société **GREENTECH** et le laboratoire **NEURODOL** a permis d'obtenir un financement de la métropole clermontoise en réponse à l'appel à projet « **Clermont Innovation / Recherche-action** » en 2021.

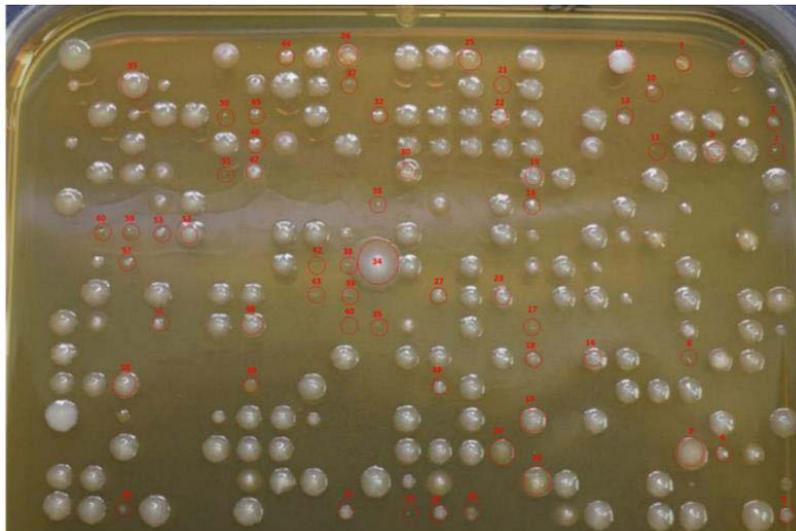
La constitution d'une banque de souches bactériennes ainsi que les techniques développées au cours de la thèse avaient pour objectif de sélectionner des souches strictement anaérobies capables de moduler l'activité de cellules neuronales mais aussi d'évaluer leur potentiel effet antalgique ou psychobiotique dans différents modèles animaux.

### 2. Matériel et méthodes

**Sélection du donneur sain :** Le choix du donneur est une étape primordiale dans ce projet. En effet, afin de maximiser les chances d'obtenir une biodiversité conséquente, 5 donneurs ont été sélectionnés sur la base du volontariat. Les donneurs sélectionnés pour l'étude ont été informés et ont signé un consentement éclairé de participation et d'exploitation des résultats. Ces donneurs ont été sélectionnés selon différents critères d'inclusions et d'exclusions en répondant à un questionnaire complet. Parmi les 5 dons de selle obtenus, l'échantillon sélectionné pour l'étude est celui présentant le maximum de viabilité cellulaire et la plus grande diversité bactérienne, évaluée par cytométrie en flux (Becton Dickinson).



**Figure 37 : Plateforme ANOXIC.** La plateforme ANOXIC est composée d'un cytomètre en flux couplé à un trieur BD Influx® équipé de 4 lasers (violet (405 nm, 100 mW), bleu (488 nm, 200 mW), rouge (640 nm, 120 mW) et ultra-violet (355 nm, 100 mW)), permettant de trier des événements de très petite dimension (particules d'un diamètre  $\geq 0.2 \mu\text{m}$ ) et de multiplexer les marqueurs utilisés, et le tout en maintenant une atmosphère anaérobie grâce à l'ajout d'un caisson à atmosphère contrôlée. Le tri cellulaire s'effectue selon différents paramètres. Alors que les paramètres de taille et de granulométrie ne nécessitent aucun marquage préalable, la viabilité cellulaire nécessite quant à elle un marquage de l'échantillon à l'aide du kit Live/Dead (SYTO9/IP). Les cellules sont également triées selon leurs paramètres de surfaces en utilisant les lectines spécifiques. La plateforme ANOXIC permet de s'affranchir des difficultés liées à l'isolement de bactéries anaérobies strictes, caractéristiques de la microflore retrouvée au niveau du colon. Ce système est innovant puisqu'il discrimine plusieurs populations bactériennes au sein de l'échantillon et permet de repiquer les bactéries d'intérêt tout en maintenant les propriétés strictement anaérobies du système.



**Figure 38 : Développement de colonies développées sur gélose anaérobie après repiquage par la plateforme automatisée ANOXIC.** Chacune des colonies correspond à un point/événement sur le cytogramme. Chaque gélose correspond aux repiquages d'un « nuage de points » (« gate ») identifié sur le cytogramme. Il est à noter que l'aspect morphologique identique de certaines colonies sur la gélose ainsi que la proximité présente entre plusieurs points d'une même sous-population sur le cytogramme pourraient indiquer que plusieurs exemplaires du même clone ont été isolés. En rouge, les isolats sélectionnés pour être cultivés en milieu liquide avant d'être réunis pour réaliser un séquençage métagénomique.

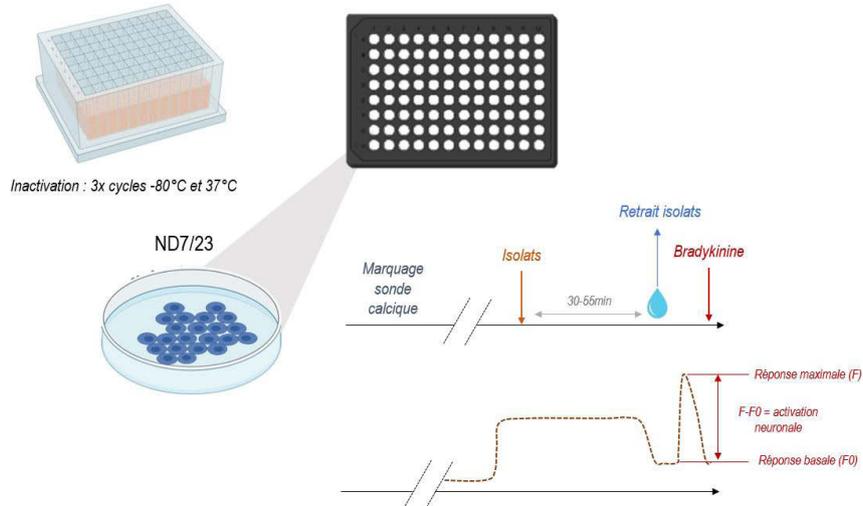
**Isolement de bactéries anaérobies strictes :** L'isolement de bactéries commensales intestinales a été réalisée en utilisant la plateforme ANOXIC équipée d'un cytomètre en flux (Becton Dickinson) et d'un trieur de cellules BD Influx® (**Figure 37**). Les critères discriminants les différentes sous-populations bactériennes étaient : la taille, la granulométrie, la viabilité cellulaire, le % en GC (DAPI) et les propriétés de surface (lectines WGA/HPA/SBA/LEA marquant les résidus saccharidiques (N acetyl glucosamine pour WGA et N acetyl galactosamine pour HPA)). L'échantillon sélectionné était celui présentant le nombre le plus important de sous-populations différentes (selon les critères de discrimination précités) soit 30 sous-populations. L'isolement de bactéries a été réalisé grâce au système de repiquage automatisé, sur un milieu GAM (GAM Agar Modified) supplémenté de 30% (v/v) de jus de rumen. Chacune des 30 géloses contenait 384 repiquages soit autant de clones bactériens, correspondant à une sous-population (1 gélose = 1 sous-population). Après 4 à 6 jours d'incubation à 37°C en conditions anaérobies, la plupart des repiquages donnait naissance à une colonie.

**Évaluation de la diversité et de la composition bactérienne par séquençage :** Pour chacune des 30 sous-populations (= 30 géloses), 96 colonies ont été repiquées dans un milieu liquide en plaque 96 puits (Deep-Well ou DW) (**Figure 38**). Après une incubation de 3 jours à 37°C en anaérobiose, 100 µL de chacune des cultures correspondant à une même sous-population (appartenant à la même gélose) ont été réunies dans un tube Falcon d'une contenance de 15 mL. Après une étape d'extraction d'ADN, une analyse métagénomique a été réalisée afin d'accéder à la diversité et à la composition contenue dans chacune des sous-populations.

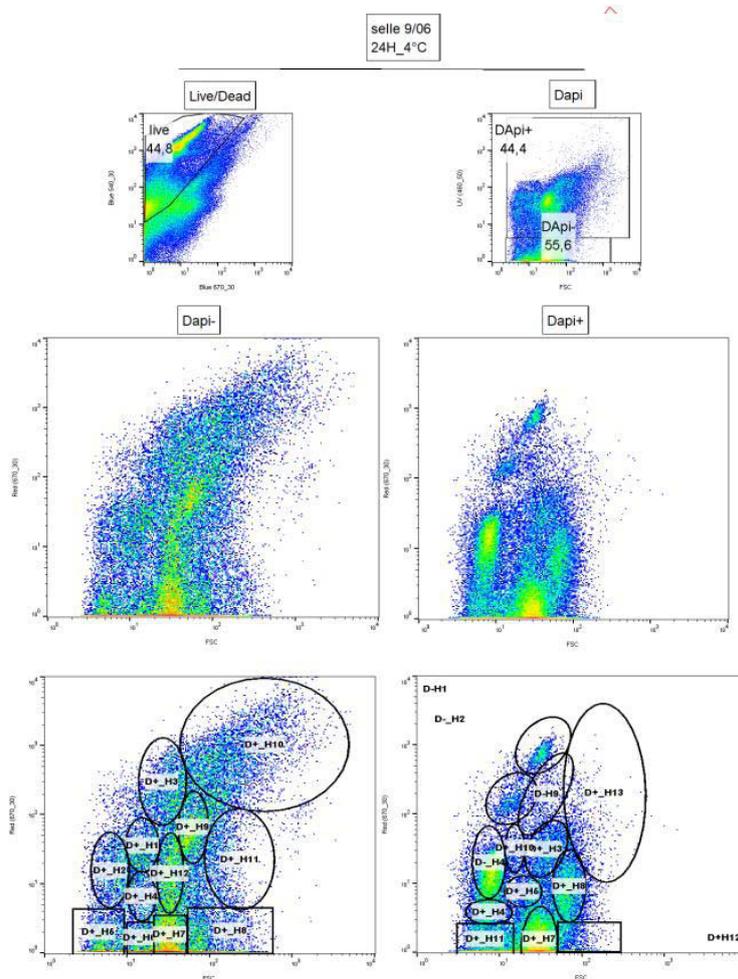
**Ciblage des bactéries sporulantes :** Afin de cibler plus spécifiquement les bactéries sporulantes, une partie de la selle a été traitée soit à l'éthanol 70% pendant 4h, soit à la chaleur (80°C pendant 20 minutes) avant d'être étalée sur gélose. Les dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  ont été étalées et l'évaluation de la diversité et de la composition bactérienne a été réalisée en suivant le protocole précédemment décrit.

**Constitution d'une banque de souches bactériennes anaérobies strictes :** Une partie des cultures réalisées en DW a été cryoconservée (100 µL glycérol / puits) à -80°C dans les locaux de la société **GREENTECH**. Un total de 1590 clones bactériens constitue cette banque.

Repiquage et culture des isolats



**Figure 39 : Protocole d'évaluation des propriétés neuromodulatrices des isolats bactériens.**



**Figure 40 : Évaluation de la diversité microbienne contenue dans un échantillon de selle fraîche humaine par cytométrie en flux.** Les cytogrammes reflètent la diversité bactérienne au sein de l'échantillon, selon différents paramètres. On distingue plusieurs sous-populations (« gates », cercles et rectangles dessinés manuellement sur les cytogrammes) selon le critère discriminant.

## **Évaluation des propriétés neuromodulatrices de bactéries commensales intestinales :**

Comme cela avait été réalisé dans le cadre de mon projet de thèse, l'effet neuromodulateur de bactéries a été évalué. Après avoir cultivé les 1590 clones bactériens, une mesure de  $DO_{600nm}$  a été réalisée pour chacune d'entre-elles afin de collecter des informations quant à la croissance de chacun des isolats. Les cultures ont ensuite été inactivées par des cycles répétés de chauffage et de congélation. Une partie des clones bactériens a été testée pour ses propriétés neuromodulatrices sur des cellules ND7/23 (6 plaques sur 30) immortalisées stimulées à la bradykinine. Dans cette expérience, les cellules ND7/23, préalablement marquées avec la sonde calcique FLIPR Calcium 6 QF (molecular devices) ont été incubées pendant 30-55 min avec chacune des cultures (30% (v/v)) avant d'être stimulées avec la bradykinine (40 nM final). Le signal d'activation mesuré est normalisé puis exprimé en valeur relative par rapport au contrôle (**Figure 39**).

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Choix du donneur, traitement de l'échantillon et constitution de la bio-banque

Comme mentionné précédemment, le choix du donneur a été motivé par la richesse bactérienne de l'échantillon de selle fourni. Pour évaluer la diversité microbienne, les selles ont été traitées à l'aide de différents marquages. La première discrimination est réalisée selon deux paramètres que sont la taille et la granulométrie cellulaire. Les bactéries vivantes ont ensuite été discriminées selon leur viabilité. Le donneur a ensuite été sélectionné en fonction du nombre de sous-populations obtenues après un marquage au DAPI et un marquage à la lectine HPA. (**Figure 40**).

L'analyse de la selle fournie par le donneur sélectionné réalisée par l'institut **BIOASTER** a permis de distinguer 30 sous-populations correspondant à 30 « nuages de points » ou « gates » sur les cytogrammes. Le repiquage de 384 cellules pour chacune des sous-populations identifiées a permis d'isoler un total de 1590 clones bactériens, dont 166 obtenus après traitement à l'éthanol ou à la chaleur. Plusieurs exemplaires de ces clones bactériens sont actuellement cryoconservés dans les locaux de la société **GREENTECH**.

**Tableau 7 : Espèces bactériennes identifiées dans les différentes sous-populations et fréquence de détection.** En orange, les espèces bactériennes détectées dans plus de 10 sous-populations, en vert, les espèces bactériennes détectées dans 1 à 2 sous-populations.

Espèces identifiées	Nombre de sous-populations dans lesquelles l'espèce a été identifiée	Espèces identifiées	Nombre de sous-populations dans lesquelles l'espèce a été identifiée
<i>Agathobaculum butyriciproducens</i>	3	<b><i>Faecalibacterium prausnitzii</i></b>	<b>14</b>
<b><i>Akkermansia muciniphila</i></b>	<b>18</b>	<i>Finegoldia magna</i>	1
<b><i>Alistipes inops</i></b>	<b>18</b>	Firmicutes bacterium CAG 110	1
<i>Alistipes sp. CHKCIO03</i>	2	Firmicutes bacterium CAG 83	6
<i>Anaeromassilibacillus sp An250</i>	8	Firmicutes bacterium CAG 94	3
<i>Bacteroides fragilis</i>	6	<i>Gemmiger formicilis</i>	6
<i>Bacteroides galacturonicus</i>	1	<b><i>Gordonibacter pamelaee</i></b>	<b>14</b>
<b><i>Bacteroides vulgatus</i></b>	<b>23</b>	<i>Lachnospira pectinoschiza</i>	1
<b><i>Bifidobacterium adolescentis</i></b>	<b>24</b>	<i>Lactobacillus gasseria</i>	3
<i>Blautia obeum</i>	3	<i>Lactobacillus rigosae</i>	1
<i>Blautia wexlerae</i>	2	<i>Lawsonibacter asaccharolyticus</i>	5
<i>Clostridium citroniae</i>	2	<b><i>Monoglobus pectinilyticus</i></b>	<b>16</b>
<i>Clostridium leptum</i>	2	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	5
<i>Clostridium methylpentosum</i>	3	Oscillibacter sp 57-20	3
<i>Corpococcus comes</i>	5	<i>Parasutterella excrementihominis</i>	1
<i>Cutibacterium acnes</i>	2	Proteobacteria bacterium CAG 139	1
<i>Dialister invisus</i>	8	<i>Proteus hauseri</i>	1
<i>Dorea formicigenerans</i>	6	<i>Proteus vulgaris</i>	1
<i>Dorea longicatena</i>	5	<b><i>Ruminococcus bromii</i></b>	<b>11</b>
<b><i>Eggerthella lenta</i></b>	<b>15</b>	<b><i>Ruminococcus lactaris</i></b>	<b>13</b>
<i>Eubacteriaceae bacterium CHKIO05</i>	3	<i>Ruminococcus torques</i>	5
<i>Eubacterium hallii</i>	4	<i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>	2
<i>Eubacterium siraeum</i>	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Eubacterium sp. CAG 180</i>	4	<i>Staphylococcus warneri</i>	3
<i>Varibaculum cambriense</i>	1	<i>Turicimonas muris</i>	1

### 3.2. Évaluation de la diversité bactérienne au sein de l'échantillon

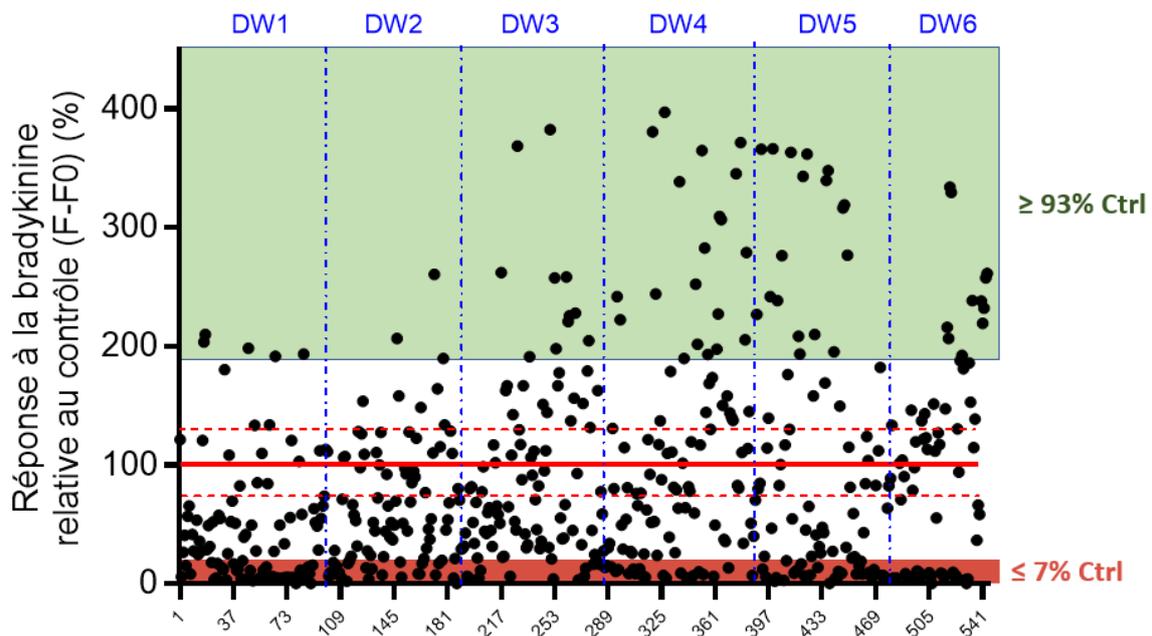
La diversité bactérienne a été évaluée au sein de chacune des sous-populations identifiées sur les cytoigrammes. Le séquençage des isolats de chacune des gélises/sous-populations indique que 50 espèces bactériennes ont été détectées avec une prévalence prédominante de *Bifidobacterium adolescentis* (retrouvée dans 24 des 30 sous-populations testées), *Bacteroides vulgatus* (23/30), *Alistipes inops* et *Akkermansia muciniphila* (18/30), *Monoglobus pectinilyticus* (16/30) et *Eggerthella lenta* (15/30) (en orange dans les **Tableau 7**). Il est à noter que ces prévalences ne donnent aucune indication quant à l'abondance de chacune des espèces dans l'échantillon initial. En effet, ce résultat pourrait révéler une limite de la technique utilisée. Le fait que la même espèce bactérienne soit retrouvée dans plusieurs sous-populations pourrait indiquer que les marqueurs de discrimination ne sont pas suffisamment spécifiques. Ces données indiquent également que la technique utilisée a permis d'isoler des bactéries reconnues pour leur extrême sensibilité à l'oxygène comme c'est le cas pour *F. prausnitzii*. Parmi ces 50 espèces, 17 d'entre-elles sont détectées dans seulement une ou deux sous-populations (gélises). À l'inverse des souches présentant une forte prévalence, ce résultat pourrait indiquer que les marqueurs utilisés permettent de discriminer plus spécifiquement ces espèces bactériennes.

Le traitement à l'éthanol et le chauffage devaient permettre de sélectionner les bactéries sporulées. L'expérience a permis de valider ce traitement puisque seules quelques espèces sont capables d'y résister. C'est notamment le cas des espèces *Dorea longicatena*, *Eubacterium hallii*, *Lachnospira pectinoschiza* et *Lactobacillus rogosae*, qui résistent au traitement à l'éthanol et de *Ruminococcus bromii* et *Eubacterium sp. CAG 180* qui résistent au traitement thermique.

Bien que cette technique ait permis d'isoler une cinquantaine d'espèces bactériennes, elle n'a pas permis d'accéder à la majorité des représentants du « core microbiote ». En effet, seulement 12 d'entre-elles ont été identifiées dans la liste proposée par Qin *et al.*, (2010) (**Tableau 8**). Parmi la liste des espèces détectées, certaines sont probablement des contaminants apportés lors de la manipulation de l'échantillon comme c'est le cas pour *S. epidermidis* ou *C. acnes*, caractéristiques du microbiote cutané. Enfin, cette technique n'a pas permis d'accéder à certains genres bactériens d'intérêt comme *Roseburia* peut-être plus difficiles à isoler ou des bactéries appartenant à l'espèce *Parabacteroides distasonis*, qui nous intéresse plus particulièrement dans notre étude et qui présente pourtant une forte prévalence chez les individus sains (Almeida, 2013).

**Tableau 8 : Espèces détectées dans l'échantillon de selle et communes à la liste du « core microbiote » proposée par Qin *et al.*, (2010).**

Espèces identifiées	Nombre de sous-populations dans lesquelles l'espèce a été identifiée
<i>Bacteroides vulgatus</i>	23
<i>Clostridium leptum</i>	2
<i>Corpococcus comes</i>	5
<i>Dorea formicigenerans</i>	6
<i>Dorea longicatena</i>	5
<i>Eubacterium hallii</i>	4
<i>Eubacterium siraeum</i>	3
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	14
<i>Ruminococcus bromii</i>	11
<i>Ruminococcus lactaris</i>	13
<i>Ruminococcus torques</i>	5

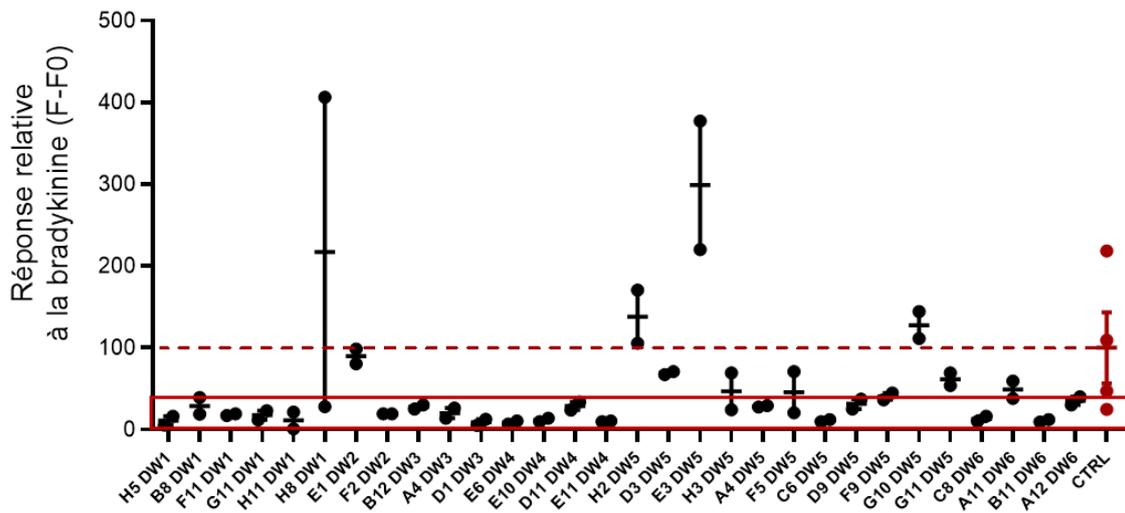


**Figure 41 : Effet neuromodulateur des clones contenus dans les 6 premières microplaques** (soit environ 576 clones bactériens). En vert, les clones bactériens ayant un effet neurostimulateur, en augmentant de plus de 93% la réponse neuronale par rapport au contrôle. En rouge, les clones bactériens ayant un effet neuroinhibiteur présentant une réponse neuronale inférieure ou égale à 7% à celle du contrôle. *DW* : *Deep-Well*, microplaque de culture correspondante (pour rappel : *DW1* = sous-population n°1, *DW2* : sous-population neuronale n°2...).

L'absence de spécificité des paramètres choisis ou encore la composition du milieu de repiquage non adaptée à toutes les espèces bactériennes sont des facteurs limitants plausibles. Malgré les limites identifiées dans ce système, la capacité d'isolement de souches strictement anaérobies demeure bien supérieure aux méthodes culturales classiques, plus contraignantes et chronophages. De plus, une optimisation du système par le développement d'anticorps spécifiquement dirigés contre des espèces bactériennes ciblées a permis d'isoler plusieurs souches de *Faecalibacterium prausnitzii* par l'équipe de **BIOASTER** et a permis d'effectuer un ciblage jusqu'au phylogroupe pour cette espèce. C'est aussi le cas pour l'espèce *Christensenella minuta*, une espèce pourtant très faiblement représentée au sein du microbiote fécal (0.01%) (Bellais *et al.*, 2022). L'utilisation de substrats marqués pourraient également être une alternative à l'utilisation d'anticorps (Tao *et al.*, 2019). Cette preuve de concept ouvre le champ à de nouvelles stratégies d'isolement de souches bactériennes, non accessibles par les méthodes culturales classiques.

### 3.3. Évaluation des propriétés neuromodulatrices des isolats bactériens

Afin d'évaluer l'effet neuroinhibiteur des isolats bactériens, un premier screening a été réalisé en simplicat en testant les 6 premières plaques (donc les clones bactériens des 6 premières sous-populations). Comme mentionné précédemment, les différents isolats ont été cultivés dans des microplaques 96 puits avant d'être inactivés par des cycles répétés « chaud-froid » (**Figure 39**). Les réponses obtenues après une stimulation à la bradykinine sont très diverses. En effet, alors que certains isolats ne modifient pas la réponse neuronale, d'autres au contraire présentent un effet excitateur ou inhibiteur. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus au cours de la thèse, qui avaient montré le potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal. En effet, en interagissant avec les neurones, certaines souches microbiennes sont capables de moduler leur activation (Defaye *et al.*, 2019; Deng and Chiu, 2021). Les résultats indiquent aussi qu'une large proportion d'isolats bactériens possède un effet inhibiteur sur l'activation neuronale (**Figure 41**).



**Figure 42 : Effet neuromodulateur des 30 clones sélectionnés pour leur potentiel neuroinhibiteur.**

Afin de sélectionner les candidats présentant le plus fort potentiel neuroinhibiteur, nous avons sélectionné les isolats capables de réduire de 93% la réponse neuronale par rapport au contrôle (soit un maximum de 7% de la réponse contrôle). Cette valeur, choisie arbitrairement, a permis de retenir 79 clones bactériens. Afin de s'affranchir des résultats « faux-positifs », nous avons vérifié que les isolats s'étaient effectivement bien développés avant d'être testés en consultant les données de  $DO_{600nm}$ . De plus, et afin de maximiser la diversité bactérienne testée, les isolats sélectionnés provenaient de différentes microplaques (donc de différentes sous-populations) puisque la probabilité de sélectionner des isolats identiques au sein de la même population est plus forte. Cette étape a permis de réduire la liste à 30 isolats.

Afin de confirmer les premiers résultats obtenus, ces 30 clones ont été testés en duplicat en suivant le même protocole (**Figure 39**). Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'effet neuroinhibiteur observé pour la majorité des clones testés. Ces clones sont de potentiels candidats pour la suite de l'étude (**Figure 42**). Les isolats bactériens restants devront être testés pour leurs propriétés neuroinhibitrices.

La mise au point d'une méthode de screening des propriétés neuromodulatrices de bactéries au cours du projet de thèse m'a donc permis de tester une partie des clones bactériens de la bio-banque. Comme cela a été étudié au cours du projet de thèse, ces données préliminaires pourraient permettre d'identifier des souches bactériennes capables de bloquer une activation impliquant la bradykinine ou ses récepteurs mais des tests complémentaires sont nécessaires. De plus, ces résultats pourront être complétés par d'autres tests *in vitro*. En effet, les isolats sélectionnés pourront être testés sur des neurones primaires issus de DRG soumis à diverses stimulations nociceptives telles que la soupe inflammatoire (et les différents éléments qui la composent comme la 5-HT, l'histamine, les prostaglandines ou encore la bradykinine), la capsaïcine ou encore le KCl. Les résultats obtenus permettront ainsi de sélectionner quelques isolats d'intérêt qui pourront être identifiés puis testés chez l'animal pour leurs propriétés antalgiques mais aussi pour leurs propriétés psychobiotiques. Pour cela, différents modèles murins disponibles au laboratoire **NEURODOL** pourront être utilisés. Étendre l'étude à d'autres espèces bactériennes permettra peut-être d'identifier de nouveaux mécanismes d'interaction entre le microbiote intestinal et le système nerveux et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des douleurs abdominales chroniques mais aussi dans les troubles neuropsychiatriques.



#### 4. Discussion générale

Cette première étape a permis de valider la technique proposée par **BIOASTER** puisqu'elle répond à l'une des difficultés rencontrées pendant mon projet de thèse : l'isolement de bactérie anaérobies strictes. En effet, bien que la culture et la production de souches anaérobies strictes soient maîtrisées au sein de la société **GREENTECH**, l'isolement demeurait une étape limitante et les techniques employées n'avaient permis d'isoler qu'une dizaine de souches plus ou moins anaérobies au cours de la première année de thèse, constituant un matériel biologique de travail limité pour le projet.

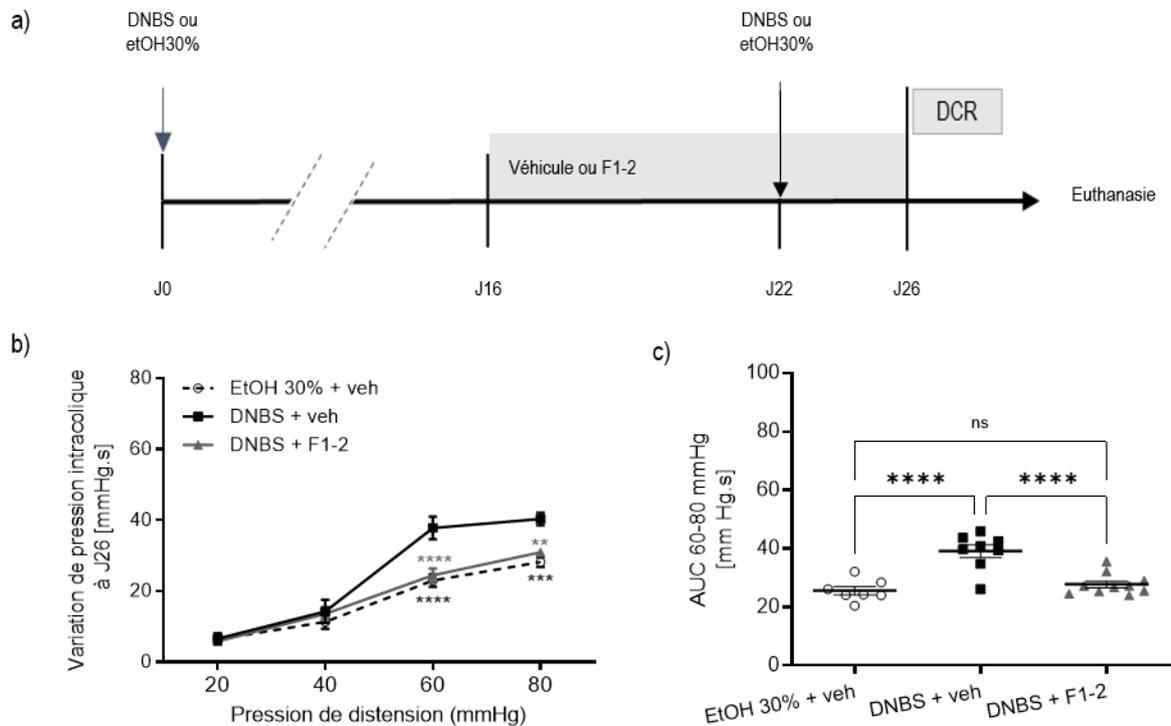
Néanmoins, cette nouvelle méthode présente quelques limites puisqu'elle n'a pas permis d'isoler tous les représentants du « core microbiote » mais des étapes d'optimisation sont en cours de développement et permettront d'accéder à toute la diversité bactérienne, y compris les espèces très peu représentées (Bellais *et al.*, 2022).

**GREENTECH** est une société développant des actifs pour des domaines d'application divers et variés comme la cosmétique, la santé animale et la santé humaine, l'agronomie ou l'environnement. La disposition de cette bio-banque de souches propriétaires et libres d'exploitation constitue une richesse non négligeable dans le développement de futurs projets de recherche. En identifiant de nouvelles souches aux propriétés antalgiques ou psychobiotiques, **GREENTECH** sera en mesure de proposer de nouvelles souches candidates parmi la liste des LBP en lice pour l'obtention d'une AMM.



# Discussion et perspectives





**Figure 43 : *P. distasonis* F1-2 exerce un effet anti-hyperalgique en réduisant l'hypersensibilité viscérale d'origine colique dans un modèle post-inflammatoire de douleur viscérale induit par instillation rectale de DNBS.** (a) Procédure expérimentale. La colite est induite par instillation rectale de DNBS ou d'éthanol 30% au jour 0 puis au jour 22. Les souris sont gavées quotidiennement pendant 10 jours avec la souche F1-2 ou le véhicule (PBS + glycérol) entre le jour 16 et le jour 26. La sensibilité colique est évaluée à la fin de l'expérience, au jour 26, par distension colorectale. Les groupes sont les suivants : EtOH30% + véhicule (n=7), DNBS + véhicule (n=8) et DNBS + F1-2 (n=10). (b) Variations de pression intracoliques en réponse aux distensions colorectales. (c) Aire sous la courbe (AUC) calculées entre 60 et 80 mmHg pour chacun des groupes. Moyenne  $\pm$  ESM. *Analyses statistiques :* (b) Moyenne  $\pm$  ESM. ANOVA 2 voies suivie d'un test de comparaison multiple de Dunnett. EtOH30% + veh vs. DNBS + veh : \*\*\* $p < 0.001$  (à 80mmHg); \*\*\*\* $p < 0,0001$  (à 60 mmHg). DNBS + veh vs. DNBS + F1-2 : \*\* $p < 0.01$  (à 80 mmHg); \*\*\*\* $p < 0,0001$  (à 60 mmHg). (c) Moyenne  $\pm$  ESM. ANOVA une voie suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey. EtOH30% + veh vs. DNBS + veh : \*\*\*\* $p < 0,0001$ . DNBS + veh vs. DNBS + F1-2 : \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## Discussion/Perspectives



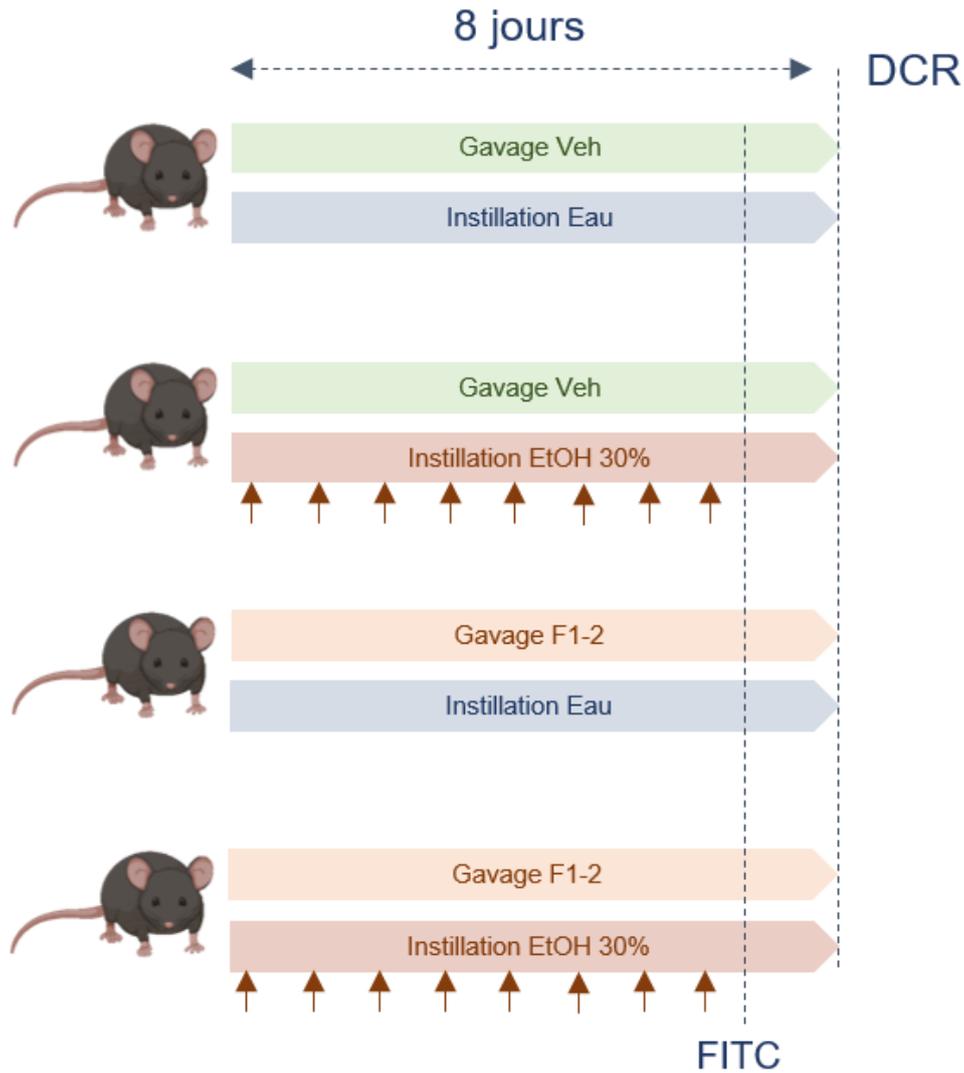
Dans ces travaux de thèse, plusieurs grands axes ont été explorés. Après avoir évalué le potentiel neuromodulateur de plusieurs souches commensales intestinales *in vitro*, la souche *Parabacteroides distasonis* F1-2 a été sélectionnée pour ses propriétés neuroinhibitrices. Cette souche a été au cœur de mes travaux de thèse puisqu'elle exerce un effet anti-hyperalgique marqué dans plusieurs modèles d'HSVC chez la souris. Ces travaux étant relativement nouveaux, les résultats obtenus suscitent aujourd'hui plusieurs interrogations quant à l'utilisation de la souche F1-2 comme nouvelle stratégie thérapeutique pour soulager les patients présentant des douleurs abdominales chroniques mais aussi quant à son mode d'action, qui seront développées dans cette discussion.

### Partie 1

#### Propriétés anti-hyperalgiques de *Parabacteroides distasonis* F1-2

##### 1. *P. distasonis* F1-2 : un traitement préventif ou curatif ?

Dans notre étude, le potentiel anti-hyperalgique de la souche *P. distasonis* F1-2 dans un modèle de douleur viscérale associée à une faible inflammation colique (DSS 0,5%) a été montré (**Article 1**). Dans ce modèle, F1-2 a été administrée par gavage dès le début de l'induction de l'inflammation colique. Ainsi, la souche F1-2 pourrait avoir une action préventive puisque l'augmentation de la sensibilité colique induite par le DSS 0,5% chez la souris est normalisée après 12 jours de gavage avec la souche F1-2. Des travaux complémentaires ont également permis de confirmer cette activité préventive dans un modèle dit de douleur post-inflammatoire, induit par 2 instillations rectales de DNBS espacées de 21 jours mis au point par Martín *et al.*, en 2015, et caractérisé par une inflammation à bas bruit ainsi que par une hausse de perméabilité intestinale (Laval *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2016). Dans ce modèle, le traitement avec la souche F1-2, administrée pendant 6 jours avant la seconde instillation (**Figure 43a**) a permis de rétablir une sensibilité colique proche de celle du groupe contrôle (**Figure 43b et 43c**) renforçant l'idée que la souche F1-2 est capable de prévenir l'HSVC chez la souris.



**Figure 44 : Effet de *P. distasonis* F1-2 dans un modèle de séparation maternelle avec induction d'une hausse de perméabilité intestinale.** Dans cette expérimentation, 4 groupes de souris NMS hypersensibles recevraient chaque jour, pendant 8 jours, une instillation rectale d'EtOH (30%) ou d'eau le matin afin de perturber l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, et un gavage de la souche F1-2 ou du véhicule correspondant (PBS + Glycérol) en fin de journée. Une mesure de perméabilité intestinale (Dextran-FITC) serait réalisée un jour avant la fin de l'expérience et la sensibilité colique serait évaluée par distension colorectale au 9<sup>ème</sup> jour de l'expérience.

Malgré l'accumulation de preuves quant à son effet bénéfique sur l'HSVC, l'administration de la souche F1-2 en même temps que l'induction du modèle rend ces résultats difficilement transposables en clinique et ne permettent pas de statuer quant à son potentiel curatif. C'est pourquoi, l'effet de F1-2 a aussi été testé dans un modèle de SII-PI suite à une infection par *Citrobacter rodentium* (Meynier *et al.*, 2022) (**Article 1**). Dans ce modèle, la souche F1-2 a été administrée en phase post-infectieuse qui pourrait s'apparenter à un traitement curatif de gastro-entérite et a également montré son efficacité sur l'HSVC induite par l'infection. Ces résultats suggèrent que F1-2 pourrait être préconisée en tant que traitement curatif. Néanmoins, le développement d'un SII et de douleurs abdominales chroniques n'étant pas systématique suite à un épisode infectieux (Barbara *et al.*, 2019), son application pourrait être limitée aux cas de SII-PI. Afin de confirmer le potentiel thérapeutique curatif de la souche F1-2, celle-ci pourrait être testée dans d'autres modèles caractérisés par une HSVC chronique, installée bien avant le début du traitement. Pour répondre à cette problématique, la souche F1-2 a été testée dans un modèle de stress néonatal induit par séparation maternelle (modèle NMS) (Meleine *et al.*, 2016; Miquel *et al.*, 2016). Dans ce modèle, la souche F1-2 n'exerce pas d'activité anti-hyperalgique (**Article 1**). Toutefois, l'atteinte au niveau de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale étant limitée, il est possible que ce modèle ne permette pas de révéler l'effet anti-hyperalgique de F1-2. C'est pourquoi, une perturbation de la barrière épithéliale dans ce même modèle par l'instillation rectale d'une solution d'éthanol à 30% pourrait favoriser l'action de la souche F1-2 (**Figure 44**). Ces résultats pourraient être appuyés par d'autres modèles murins disponibles et maîtrisés au laboratoire. C'est notamment le cas des souris déficientes pour le gène codant le récepteur TLR5, qui, au-delà de développer des symptômes caractéristiques du syndrome métabolique ou de l'obésité (Vijay-Kumar *et al.*, 2010), sont aussi caractérisées par une inflammation à bas bruit (Carvalho *et al.*, 2012) ainsi que par une HSVC persistante observée au sein du laboratoire. Dans cette expérience complémentaire, le niveau de sensibilité colique pourrait être évalué par DCR avant et après un traitement avec la souche F1-2 dont la durée reste à déterminer. Enfin, il est aujourd'hui admis que la nutrition a un impact sur la santé. Le développement de modèles animaux a notamment permis de montrer que l'administration d'un régime riche en graisse pendant 12 à 16 semaines conduisait au développement d'une HSVC (Groover *et al.*, 2013; Tramullas *et al.*, 2016) impliquant plus spécifiquement le récepteur TLR4, tant au niveau central que périphérique (Tramullas *et al.*, 2016). Bien que peu de données soient disponibles sur l'effet d'un tel régime sur la perméabilité intestinale (Cani *et al.*, 2008), ces modèles d'HSVC persistante pourraient constituer un terrain propice à l'évaluation du potentiel curatif de la souche F1-2.



## 2. Autres effets de *P. distasonis* F1-2 : impact du traitement par F1-2 sur l'inflammation ou sur la restauration de la barrière épithéliale intestinale ?

Le dosage de médiateurs inflammatoires par ELISA a permis de révéler une inflammation à bas bruit caractérisée par une hausse significative de Lipocaline 2, de CXCL1/KC (IL-8) et d'IL-1 $\beta$  au niveau colique chez les animaux ayant reçu 0.5% de DSS dans l'eau de boisson. Le traitement F1-2 n'a pas permis de réduire significativement ces 3 médiateurs inflammatoires suggérant que la souche F1-2 exerce un effet anti-hyperalgique, *a priori* indépendant de l'inflammation. Le dosage de 18 médiateurs inflammatoires par la technologie LUMINEX® a permis d'explorer les voies Th1/Th2 et Th17 de l'inflammation. Les résultats ont confirmé l'absence d'une inflammation marquée dans ce modèle et n'ont pas permis de statuer quant au caractère anti-inflammatoire de la souche F1-2 (**Article 1**). Pourtant, les propriétés anti-inflammatoires de certaines souches de *P. distasonis* ont été décrites dans plusieurs modèles (Cekanaviciute *et al.*, 2017; Cuffaro *et al.*, 2020; Hiippala *et al.*, 2020; Koh *et al.*, 2020; Kverka *et al.*, 2011). Toutefois, les résultats sont parfois contradictoires et semblent être souche-dépendants. En effet, Hiippala *et al.*, (2020) ont montré que seulement 3 des 6 souches testées exerçaient un effet anti-inflammatoire en réduisant la libération d'IL-8 par des cellules HT29 stimulées au LPS. Afin de statuer quant au potentiel anti-inflammatoire de la souche F1-2, une expérience complémentaire pourrait être réalisée en administrant une dose de DSS plus élevée favorisant la mise en place d'une inflammation plus marquée.

Alors que l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale est perturbée dans la plupart des modèles d'HSVC utilisés dans notre étude, la souche F1-2 ne semble pas restaurer une perméabilité proche de celle des animaux du groupe contrôle (**Article 1**). Pourtant, en restaurant l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, certaines bactéries pourraient limiter la translocation bactérienne et moduler l'HSVC. Ces propriétés ont d'ailleurs été décrites *in vitro* (Cuffaro *et al.*, 2020; Hiippala *et al.*, 2020) mais aussi *in vivo* (Cuffaro *et al.*, 2020; Koh *et al.*, 2020) chez certaines souches appartenant à l'espèce *P. distasonis*. Un dosage des protéines de jonctions serrées telles que l'OCCLUDINE ou ZO-1 permettrait de confirmer l'absence d'effet bénéfique sur le rétablissement de la perméabilité intestinale par la souche F1-2.

Ainsi les propriétés anti-inflammatoires ou de renforcement de la barrière épithéliale intestinale décrites dans la littérature pour certaines souches de *P. distasonis* n'ont pas été retrouvées dans nos expérimentations. Au niveau intestinal, il n'est pas rare d'observer de la variabilité au sein d'une espèce bactérienne.



C'est notamment ce qui a été montré pour *Faecalibacterium prausnitzii*, pour laquelle plusieurs phylotypes ont été décrits (Fitzgerald *et al.*, 2018). L'espèce *Akkermansia muciniphila* semble également présenter une variabilité importante (Becken *et al.*, 2021). Finalement, ces résultats renforcent l'intérêt porté à la souche *P. distasonis* F1-2.

### 3. *P. distasonis* F1-2 présente-t-elle des propriétés psychobiotiques ?

Au-delà des atteintes intestinales, l'anxiété et la dépression sont des troubles psychiatriques partagés par une grande partie des patients atteints de MICI et de SII. En effet, il a été rapporté que 32,1% à 39.1% de ces patients souffraient d'anxiété et que 25.2% à 28.8% étaient atteints de dépression (Barberio *et al.*, 2021; Geng *et al.*, 2018; Zamani *et al.*, 2019). De plus, comme décrit dans le chapitre 1 de la **Revue bibliographique** de ce manuscrit, les nombreuses données générées grâce aux progrès technologiques ont permis de mettre en évidence une dysbiose chez les patients atteints de dépression ou d'anxiété, caractérisée par une perte de diversité microbienne. La caractérisation de cette dysbiose a permis de révéler, entre-autres, la diminution de l'abondance des espèces appartenant au genre *Parabacteroides* chez ces patients (Barandouzi *et al.*, 2020). De plus, le microbiote intestinal est capable de synthétiser un grand nombre de métabolites pouvant moduler le comportement et contribuer positivement ou négativement au développement de troubles cognitivo-émotionnels comme les troubles anxio-dépressifs (Averina *et al.*, 2020). Parmi eux, le GABA nous intéresse plus particulièrement puisque certaines souches probiotiques capables de moduler la teneur en GABA exercent des effets bénéfiques en réduisant les symptômes de la dépression (Tette *et al.*, 2022).

Dans notre étude, et en accord avec la littérature, la capacité de la souche *P. distasonis* F1-2 à convertir le glutamate en GABA a été montrée (Otaru *et al.*, 2021). La synthèse de GABA par cette souche pourrait lui permettre d'agir au niveau central. Dans le modèle de SII-PI suite à une infection par *C. rodentium*, l'effet de F1-2 sur le comportement anxieux a été évalué en réalisant le test de labyrinthe en croix surélevé (« Elevated plus maze » ou EPM) et n'a pas révélé d'effet bénéfique (**Article 1**). Bien que ces premières données semblent indiquer l'absence d'effet anxiolytique de la souche F1-2, elles sont aujourd'hui insuffisantes pour statuer sur le potentiel psychobiotique de la souche F1-2 et nécessitent d'être complétées en réalisant d'autres tests de référence comme le test de la planche à trou (Hamieh *et al.*, 2021).



Ce modèle de SII-PI étant caractérisé par le développement de troubles cognitifs, la réalisation de tests tels que le laboratoire en Y (Y-Maze), le test de la reconnaissance d'objet nouveau (« Novel Object Recognition » ou NOR) et de localisation (« Novel location recognition » ou NLR) permettraient d'évaluer respectivement la mémoire spatiale de travail, la mémoire de reconnaissance à moyen terme et l'exploration (Meynier *et al.*, 2022). Enfin, la mise en évidence d'un trouble dépressif à un stade plus tardif chez ces animaux permettrait, par le test de suspension par la queue ou le test de nage forcée, d'évaluer l'effet de F1-2 sur la dépression. Néanmoins, les modalités du traitement pourraient être modifiées (moment, durée) puisqu'il est possible qu'une action au niveau central nécessite un traitement plus long que celui utilisé lors de ces travaux de thèse.

Le modèle de SII-PI n'est pas le seul modèle dans lequel les propriétés anxiolytiques peuvent être évaluées puisque l'administration de 2.5% de DSS pendant 5 jours a également été décrite pour induire un comportement de type anxieux chez la souris (Nyuyki *et al.*, 2018). Ainsi, un test complémentaire pourrait être réalisé en évaluant l'anxiété dans un modèle de colite induite chimiquement par l'administration de DSS dans l'eau de boisson, à 2,5% mais aussi à 0,5% comme cela a été réalisé dans le cadre de mes travaux de thèse.

#### **4. Potentiel thérapeutique de *P. distasonis* : des propriétés bénéfiques non partagées par toutes les souches de l'espèce ?**

Bien que *P. distasonis* présente une forte prévalence dans la population humaine estimée à 91.7% (Almeida, 2013), une grande variabilité a été retrouvée au sein de l'espèce. En effet, alors que certaines souches exercent des effets bénéfiques (Cuffaro *et al.*, 2020; Hiippala *et al.*, 2020), il semblerait que ceux-ci ne soient pas partagés par l'ensemble des souches de cette espèce bactérienne. L'effet anti-hyperalgique de *P. distasonis* sur l'HSVC n'ayant jamais été étudié auparavant, nous l'avons comparé à la souche de référence de la même espèce provenant de la collection ATCC (ATCC 8503) dans le modèle d'HSVC associé à une faible inflammation induite par l'administration de DSS à 0,5% dans l'eau de boisson (**Article 1**). Alors que la souche *P. distasonis* F1-2 exerce un effet anti-hyperalgique marqué, cette propriété n'est pas retrouvée chez la souche de référence ATCC 8503. Pourtant, les conditions de culture, la dose administrée ainsi que la procédure expérimentale étaient identiques. Ceci est donc en adéquation avec la variabilité décrite au sein de cette espèce.



La constitution d'une banque de souches appartenant à cette espèce bactérienne grâce à la plateforme **ANOXIC** développée par l'Institut **BIOASTER** et à l'utilisation d'anticorps spécifiques permettrait d'explorer son activité anti-hyperalgique au sein de l'espèce et de mieux comprendre le mode d'action de F1-2.

L'une des stratégies pouvant être adoptée afin de comprendre ce qui différencie la souche F1-2 de la souche de référence ATCC 8503 est basée sur la comparaison de leurs génomes. La souche F1-2 ayant été intégralement séquencée au cours de mes travaux de thèse, l'identification des différences, que ce soit au niveau génomique ou transcriptionnel constitue une véritable source d'informations à exploiter dans de futurs travaux. Comme mentionné précédemment, une myriade de composés microbiens peut contribuer au développement de ces troubles cognitivo-émotionnels. L'espèce bactérienne *P. distasonis* étant relativement peu connue, une analyse métabolomique dirigée ciblant la synthèse de neurotransmetteurs dans le milieu de culture pourrait permettre de mieux caractériser son potentiel psychobiotique.

## **5. Évaluation des propriétés antalgiques et psychobiotiques de *P. distasonis* F1-2 chez l'Homme**

La démonstration des propriétés anti-hyperalgiques exercées par la souche F1-2 dans plusieurs modèles murins renforce la possibilité de proposer l'utilisation de la souche F1-2 chez l'Homme pour soulager les douleurs abdominales chroniques associées à une HSVC. Cependant, le chemin est encore long avant de pouvoir la classer dans les « Live Biotherapeutic Products ». En effet, au-delà des contraintes réglementaires liées à ce type de produit (**Revue bibliographique - Chapitre III**), plusieurs verrous scientifiques et technologiques doivent être levés afin d'en assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité. Pour cela, une analyse des risques doit être amorcée en amont (Rouanet *et al.*, 2020). Au cours de ma thèse, certains de ces verrous ont été rapidement identifiés. Ce travail d'anticipation est indispensable dans le développement d'un produit, quel qu'il soit, et permet d'aborder les étapes critiques représentées par : (1) la maîtrise de la production à grande échelle (« scale-up ») et de la conservation, (2) la sécurité du produit et (3) son efficacité. Alors que l'étape de « scale-up » a d'ores et déjà été amorcée au cours de mes travaux et que les premières preuves de l'innocuité de la souche chez l'animal ont été apportées (**Données complémentaires**), l'efficacité et le maintien des propriétés bénéfiques chez l'Homme n'ont encore jamais été évalués. La démonstration de l'efficacité d'un produit pharmaceutique nécessite la conduite d'essais cliniques chez l'Homme. Plusieurs critères doivent être définis au préalable : la dose, le mode d'administration, les critères d'évaluation de son efficacité et surtout l'identification de la population ciblée par le traitement.



Dans ce contexte, et afin d'établir un lien entre la faible abondance de *P. distasonis* et le développement de douleurs abdominales chroniques chez les patients atteints de SII ou de MICI, une étude clinique pourrait être réalisée afin de quantifier l'espèce chez les différents sujets. Ces données permettraient de cibler plus spécifiquement la population recevant le traitement F1-2 ou de déterminer des critères d'inclusion dans le cadre d'un essai clinique. Dans un second temps, l'essai clinique pourrait être réalisé chez des patients SII répondant aux critères de Rome IV (femmes et hommes, 18-70 ans) en distinguant les patients présentant une perméabilité intestinale significativement augmentée (« leaky gut »), des autres patients. Cette étude permettrait ainsi d'évaluer l'efficacité du traitement et de connaître la contribution d'une perturbation de la barrière intestinale sur l'effet antalgique de *P. distasonis* F1-2. Ces données seraient d'autant plus intéressantes puisqu'une part importante de patients atteints de pathologies intestinales présente une hausse de perméabilité intestinale. En effet, dans le cas du SII, l'intégrité de la barrière épithéliale est perturbée dans 17-50% pour le SII-PI, dans 37-62% pour le SII-D et dans 4-25% pour le SII-C (Hanning *et al.*, 2021) mais aussi chez 40% des patients atteints de MICI (Michielan and D'Inca, 2015).

Dans le cadre de cette étude, plusieurs paramètres pourraient être évalués en plus des douleurs abdominales ressenties par le patient. Plusieurs questionnaires permettraient ainsi d'évaluer le score d'intensité de la douleur abdominale, la gravité des symptômes du SII (SII-SSS), la qualité de vie (SII-QoL), le score d'anxiété et de dépression (HADS), la fréquence et de l'uniformité des selles ainsi qu'un questionnaire relatif à la nutrition des patients pendant l'étude. Le format d'administration et la durée du traitement sont à déterminer mais, à l'image de l'étude clinique menée par la société 4DPharma (Blautix, *Blautia Hydrogenotrophica*) en 2020, le traitement pourrait consister en la prise de 2 capsules, 2 fois par jour correspondant à une dose maximale journalière de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries, et ceci pendant 8 semaines (clinicaltrials.gov, Trial record : NCT03721107).



## Partie 2

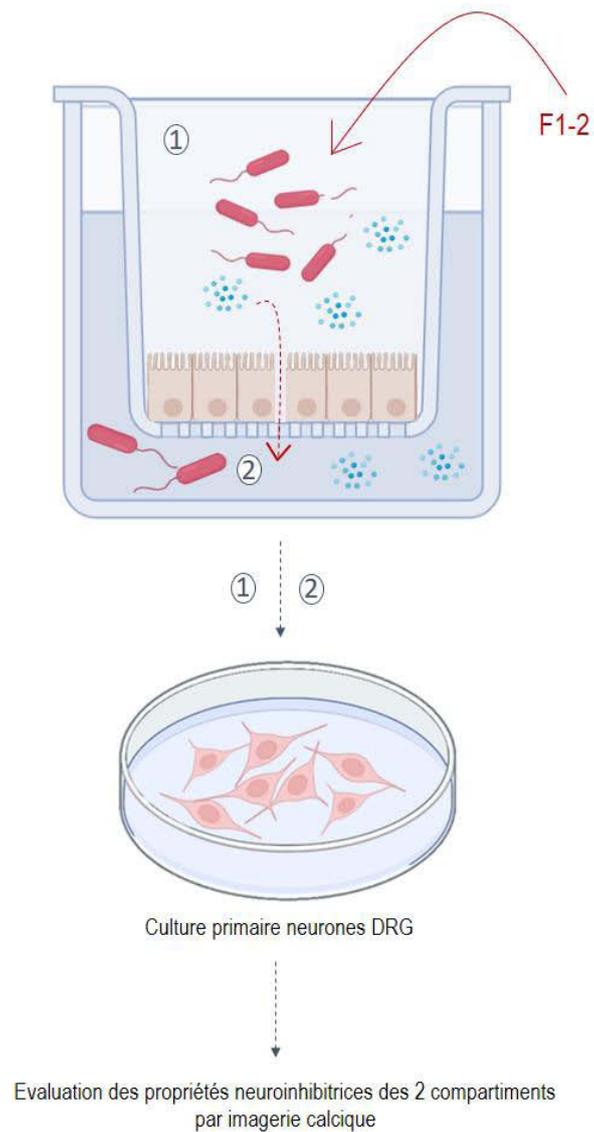
### Mécanisme d'action de *P. distasonis* F1-2 à l'origine de l'effet anti-hyperalgique

#### 1. L'effet anti-hyperalgique de *P. distasonis* F1-2 pourrait-il passer par une interaction indirecte avec le système nerveux ?

##### 1.1. *P. distasonis* F1-2 pourrait-elle agir en modulant la composition du microbiote intestinal ?

Les propriétés bénéfiques exercées par la souche F1-2 peuvent être le résultat d'une action plus ou moins directe avec le système nerveux puisqu'elle pourrait agir à différents niveaux. Comme évoqué dans la **Revue bibliographique** de ce manuscrit, le microbiote intestinal joue un rôle clé dans la santé de l'hôte et pourrait participer au développement de douleurs abdominales chroniques chez l'Homme, notamment lorsque sa composition est perturbée. L'impact de F1-2 sur le microbiote intestinal est encore inconnu à ce jour. Pourtant, et comme cela a déjà été décrit chez l'Homme (Ishikawa *et al.*, 2003) et chez l'animal (Gaudier *et al.*, 2005), certaines souches probiotiques peuvent agir en modifiant la composition du microbiote ou son métabolisme dans le cas de certaines pathologies et pourrait contribuer aux effets bénéfiques observés. Ces effets pourraient notamment passer par une compétition avec les bactéries pro-inflammatoires délétères et par le rétablissement d'un microbiote équilibré en restaurant l'abondance de certaines espèces bactériennes bénéfiques comme c'est le cas pour l'espèce *Akkermansia muciniphila* dont l'abondance est retrouvée diminuée chez les patients atteints d'obésité (Alard *et al.*, 2016) ou encore de *F. prausnitzii* dans le cas de MICI (Machiels *et al.*, 2014). L'établissement du profil microbien et métabolomique dans ces modèles animaux, avant et après l'administration des différents traitements au niveau fécal mais aussi à proximité de la muqueuse colique permettrait ainsi de mesurer l'impact du traitement F1-2 sur le microbiote intestinal et sur son métabolisme.

Comme évoqué dans la **Revue bibliographique** de ce manuscrit, les différents membres du microbiote intestinal évoluent en symbiose. Cette symbiose peut notamment se traduire par des phénomènes d'alimentation métabolique croisée également appelés « cross-feeding », au sein desquels chaque espèce bactérienne influence la croissance d'autres espèces.



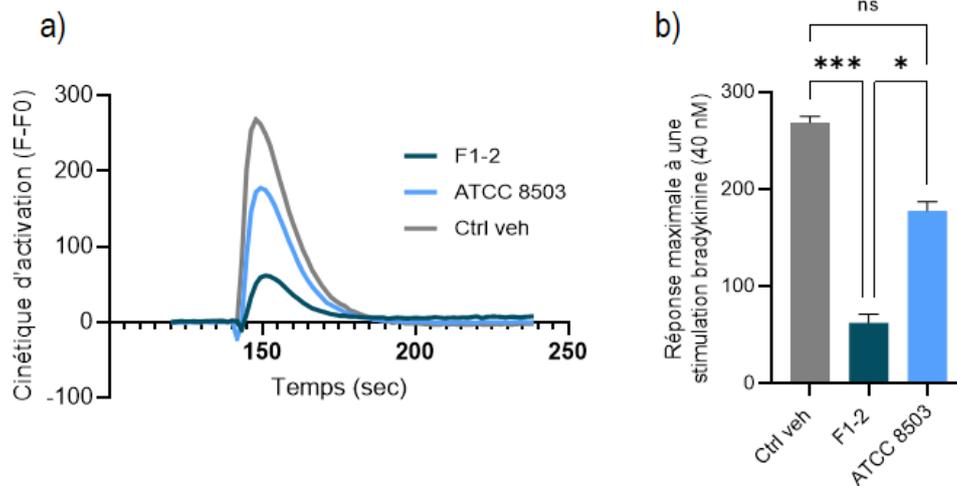
**Figure 45 : Évaluation de l'activité de *P. distasonis* F1-2 via une interaction avec l'épithélium.** Dans cette expérience, la souche F1-2 est déposée dans la partie supérieure de la culture de cellules Caco-2 en Transwell. Après un temps défini, les deux compartiments (1 et 2) sont récupérés afin d'être testés pour leurs propriétés neuromodulatrices sur une culture primaire de neurones de DRG de souris, par la technique d'imagerie calcique.

Afin d'évaluer, *in vitro*, l'influence de *P. distasonis* F1-2 sur les autres espèces bactériennes colonisant le côlon, l'utilisation de digesteurs artificiels mimant le processus digestif humain peut être envisagée. Ces digesteurs sont des outils puissants permettant de modéliser les paramètres essentiels de la digestion. Plusieurs modèles dynamiques gastro-intestinaux existent à l'heure actuelle. Le TIM (TNO Intestinal Model) par exemple, permet de reproduire les principales étapes de la digestion (le brassage du chyme, les vidanges gastrique et intestinale, l'acidification gastrique et la neutralisation du pH en phase intestinale, l'addition séquentielle des sécrétions digestives et l'absorption dans les parties intestinales de l'eau et des produits de digestion par un système de dialyse). D'autres systèmes comme le SHIME (Simulated Human Intestinal Microbial Ecosystem), constitué d'un ensemble de fermenteurs maintenus en anaérobiose, permet aussi de suivre un grand nombre de paramètres comme l'évolution de la composition du microbiote intestinal (luminal et mucosal) mais va aussi permettre le dosage de métabolites (Guerra *et al.*, 2012).

Enfin, comme cela a déjà été réalisé pour le pathogène murin *C. rodentium* (Wiles *et al.*, 2006), l'acquisition de propriétés bioluminescentes par modification génétique de F1-2 permettrait d'évaluer sa capacité à s'implanter dans le TGI, de la localiser mais aussi de s'assurer qu'aucun phénomène de translocation n'a lieu.

### ***1.2. Parabacteroides distasonis F1-2 pourrait-elle interagir avec les cellules épithéliales intestinales ?***

L'idée qu'un contact direct avec le système nerveux sous-jacent soit à l'origine de l'effet anti-hyperalgique observé *in vivo* est séduisante mais les mécanismes d'action peuvent être plus complexes et impliquer une interaction avec les cellules épithéliales intestinales. C'est notamment ce qui a été récemment démontré par l'équipe de Nicolas Cenac en 2021. Le composé lipidique C18-30H synthétisé par certaines espèces bactériennes intestinales entre dans les cellules épithéliales mais ne les traverse pas. En se liant au récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , ce composé pourrait être responsable de l'effet anti-inflammatoire observé (Pujo *et al.*, 2021). Dans la même idée, l'utilisation d'inserts de culture cellulaire Transwell® permettrait de reproduire un épithélium intestinal et d'évaluer la capacité de la souche F1-2 à passer la barrière épithéliale intestinale mais aussi de récupérer le sous-nagent afin de le tester pour ses propriétés neuromodulatrices (**Figure 45**). Dans le cas où l'activité neuromodulatrice serait retrouvée dans le sous-nagent de culture, il sera possible de le caractériser en évaluant sa composition.



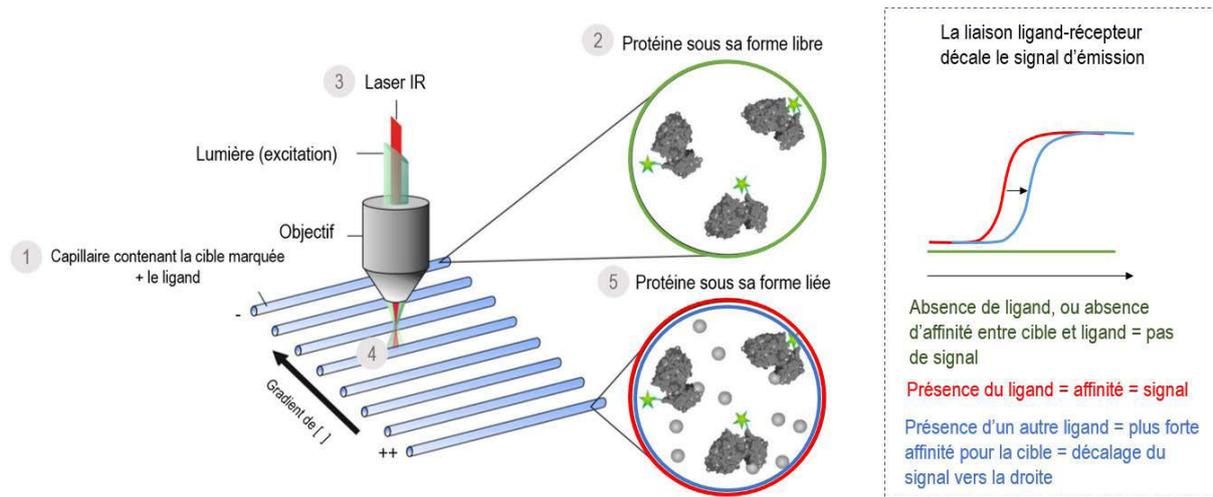
**Figure 46 : *Parabacteroides distasonis* F1-2 exerce un effet neuroinhibiteur supérieur à celui de la souche de référence ATCC 8503.** a) Signal d'activation de cellules ND7/23 stimulées à la bradykinine (40 nM) après une incubation de 45 min avec F1-2, ATCC 8503 ou le véhicule. b) Réponse maximale à la stimulation. Moyenne  $\pm$  ESM. ( $n = 4$  à  $8$  / condition). Analyse statistique : Test Kruskal-Wallis. Ctrl+veh vs. F1-2 : \*\*\* $p < 0.001$  ; F1-2 vs. ATCC 8503 : \* $p < 0.05$  ; Ctrl + veh vs. ATCC 8503 : ns.

Cela permettra aussi de savoir si l'activité est portée par la biomasse bactérienne ou bien par un métabolite, qu'il provienne de la bactérie ou des cellules de l'hôte, en réponse à l'interaction.

## **2. L'effet anti-hyperalgique de *P. distasonis* F1-2 pourrait-il passer par une interaction directe avec le système nerveux ?**

Mes travaux de thèse ont permis de révéler les propriétés neuromodulatrices de la souche *P. distasonis* F1-2. La capacité de la souche F1-2 à réduire l'activation de neurones est un phénomène qui pourrait contribuer à l'effet anti-hyperalgique observé *in vivo*. L'identification du composé bactérien actif constitue un double enjeu : (i) d'une part, elle apporterait des informations cruciales quant aux mécanismes d'interaction entre le microbiote intestinal et notre système nerveux. (ii) D'autre part, cela permettrait, en adaptant les paramètres de culture, d'optimiser la production de ce(s) composé(s) par la souche bactérienne afin de potentialiser son effet. De plus, une étape de purification du composé neuroinhibiteur pourrait être envisagée afin de s'affranchir des contraintes réglementaires liées à l'exploitation de souches probiotiques comme nouveau médicament comme mentionné dans la **Revue bibliographique** de ce manuscrit. Ainsi, une meilleure caractérisation de ces processus d'interaction établis entre F1-2 et le système nerveux garantirait de meilleures chances de succès pour son exploitation en santé humaine. La caractérisation du mode d'action de LBP faisant actuellement l'objet d'études cliniques a d'ores et déjà été amorcée. C'est notamment le cas de *Faecalibacterium prausnitzii*, chez qui la protéine MAM a été identifiée comme responsable de son effet anti-inflammatoire (Breyner *et al.*, 2017), mais aussi de la protéine Amuc\_1100 ou du polysaccharide A (PSA) portés respectivement par *Akkermansia muciniphila* et *Bacteroides fragilis*, à l'origine de leurs propriétés immunomodulatrices (Ottman *et al.*, 2017; Troy and Kasper, 2010), des LBP qui figureront probablement dans la liste de médicaments microbiotiques dans les années à venir.

Comme évoqué dans l'**Article 1**, le potentiel neuroinhibiteur de la souche F1-2 se traduit par une diminution du niveau d'activation de cellules neuronales ND7/23 stimulées à la bradykinine. La comparaison avec la souche de référence a révélé que, contrairement à F1-2, la souche ATCC 8503 n'exerçait pas un effet neuroinhibiteur aussi marqué (**Figure 46**). La différence au niveau de l'activité observée entre ces 2 souches *in vitro* coïncide avec l'absence d'activité anti-hyperalgique dans le modèle de colite induite par une dose de DSS à 0,5% (**Article 1**).

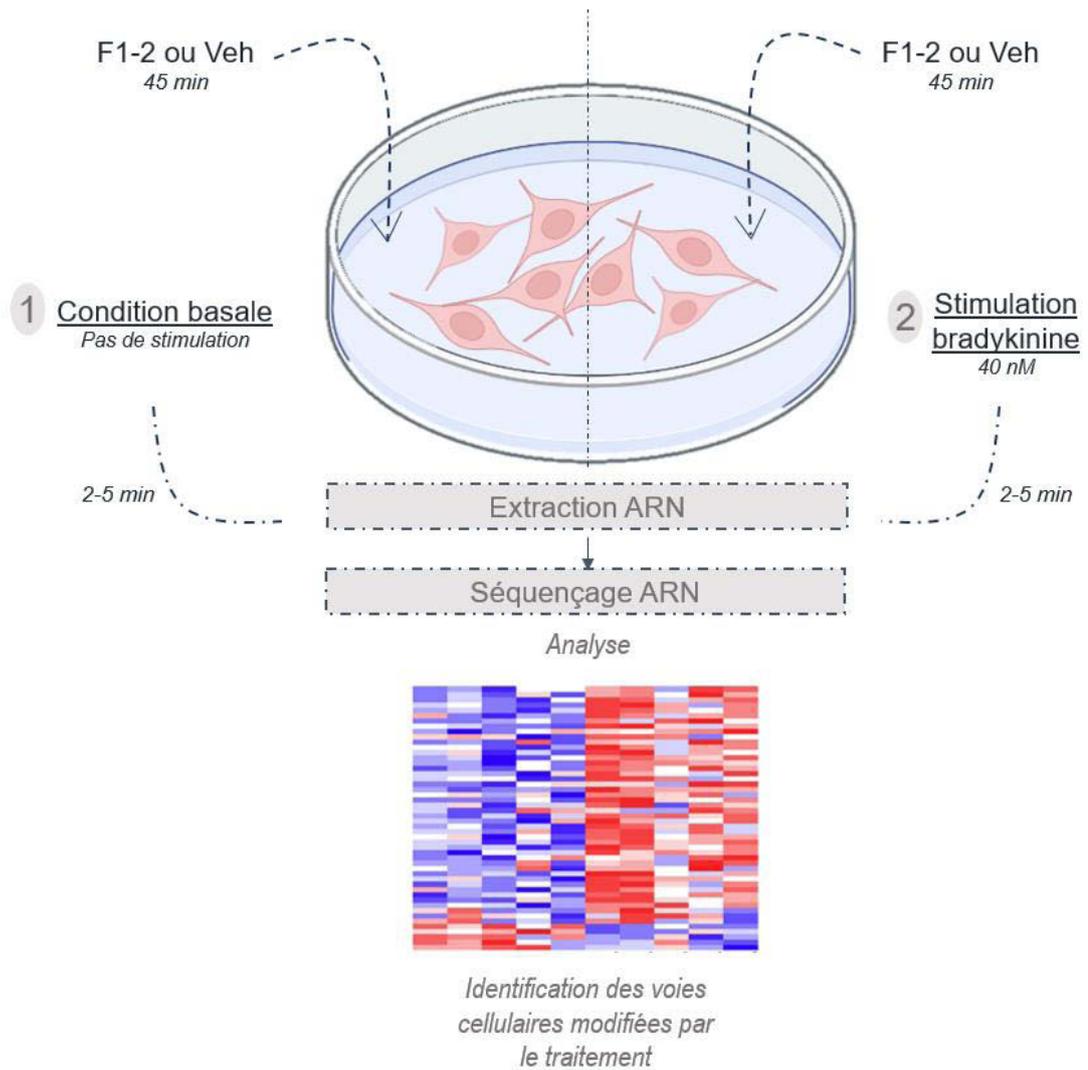


**Figure 47 : Principe de la technologie Monolith (Nanotemper).** Cette technique permet de quantifier et d'évaluer l'affinité d'une interaction entre une cible et son ligand. (1) La solution contenant la cible marquée (fluorochrome) ainsi que le potentiel ligand est chargée dans des capillaires en respectant un gradient de concentrations croissantes. (2) À la plus faible concentration en ligand, la cible n'émet pas ou peu de fluorescence (3) lorsque le faisceau lumineux excite la cible. (4) La cible émet une fluorescence croissante à mesure que la concentration en ligand augmente. Les courbes obtenues peuvent être analysées de la façon suivante : en absence de ligand ou lorsque le ligand ne présente aucune affinité pour sa cible, aucun signal n'est détecté (en vert). Lorsqu'un ligand est présent, un signal fluorescent croissant est détecté à mesure que sa concentration augmente (en rouge). Enfin, lorsqu'un décalage de la courbe de fluorescence vers la droite est observé, cela signifie que le ligand testé présente une plus faible affinité pour sa cible (en bleu).

Ces résultats suggèrent que (i) l'activité neuroinhibitrice de F1-2 pourrait être à l'origine de ses propriétés anti-hyperalgiques et que (ii) les 2 souches testées sont différentes d'un point de vue des activités antalgiques et neuromodulatrices ce qui renforce l'idée que l'effet bénéfique puisse être souche-dépendant.

Il est probable que plusieurs voies moléculaires contribuent à l'effet neuroinhibiteur puisqu'une myriade de composés bactériens ont la capacité d'interagir avec les neurones (Defaye *et al.*, 2019; Deng and Chiu 2021; Lomax *et al.*, 2019). Bien que les résultats obtenus *in vitro* suggèrent l'implication du/des récepteur(s) à la bradykinine dans l'interaction bactérie-neurone, l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs ne permettrait pas de confirmer ces résultats puisqu'ils masqueraient le signal d'activation. C'est pourquoi, la recherche d'une technique alternative semble indispensable afin de valider l'interaction « ligand-récepteur ». Celle-ci pourrait notamment être confirmée, *in vitro*, en utilisant la technologie Monolith (Nanotemper). Cette technique permet de quantifier les interactions moléculaires entre une cible et son ligand grâce à la détection des changements d'intensité de fluorescence. Le signal fluorescent provient alors de la cible préalablement marquée (dans notre cas le(s) récepteur(s) à la bradykinine) et la constante d'affinité ( $K_d$ ) est calculée à partir d'une courbe traçant la fluorescence normalisée par rapport à la concentration du ligand (**Figure 47**). Dans cette expérience, la cible, autrement dit les récepteurs à la bradykinine, devront être marqués préalablement avant d'établir le contact avec la souche F1-2.

L'interaction entre la souche F1-2 et les récepteurs à la bradykinine devra aussi être confirmée *in vivo*. L'implication de la bradykinine ou de ses récepteurs dans la colite induite chimiquement chez la souris a d'ores et déjà été démontrée, et ceci, dans des modèles similaires à ceux utilisés au cours de ce projet. En effet, plusieurs souris déficientes pour des gènes ciblant la voie de synthèse de la bradykinine ont permis de réduire la sévérité de la colite dans différents modèles, y compris dans le modèle de colite induite par l'administration de DSS dans l'eau de boisson (Wang *et al.*, 2018). Toutefois, bien que la délétion du gène codant la pKaI, de son cofacteur HK ou des récepteurs à la bradykinine BR1 et BR2 permettent de limiter la perte de poids des animaux, le score de sévérité ou l'HSVC n'a pas été évaluée dans ces modèles. La démonstration d'une HSVC persistante chez ces souris déficientes pour les gènes précités est donc une étape indispensable et permettrait de tester la souche F1-2 dans ces différents modèles. Cette approche génétique pourrait être complétée par une approche pharmacologique.



**Figure 48 : Évaluation de l'effet de *P. distasonis* F1-2 sur les voies cellulaires de cellules ND7/23 activées par une stimulation à la bradykinine.**

L'utilisation d'antagonistes spécifiques des récepteurs BR1 et BR2 permettrait ainsi d'évaluer leur contribution dans l'interaction (Arai *et al.*, 1999; Jaggar *et al.*, 1998).

L'idée que l'interaction entre F1-2 et le système nerveux n'engage que cette voie reste peu probable. Afin d'avoir une vision plus globale et d'explorer les voies de signalisation cellulaire, le séquençage du transcriptome des cellules neuronales par RNAseq pourrait être envisagé puisqu'il permettrait d'accéder aux activités cellulaires, à un instant donné. Cette technique permettrait d'évaluer le potentiel modulateur de *P. distasonis* F1-2 sur les voies cellulaires en lien avec l'activation neuronale. Cette expérience pourrait être réalisée *in vitro*, dans un premier temps sur des cellules ND7/23 (**Figure 48**) puis sur des neurones primaires de DRG avant d'être appliquée à des extraits de côlons d'animaux issus du modèle de colite induite au DSS.

?

?

?

?

?

?

?

?

?



## Conclusion générale

☐

Ce travail de thèse a permis de révéler le potentiel neuromodulateur de certaines espèces bactériennes commensales intestinales et ceci, grâce à la mise au point d'une méthode de screening à haut débit. Ce potentiel neuromodulateur laisse penser que le microbiote intestinal pourrait moduler le processus douloureux. Parmi elles, la souche *Parabacteroides distasonis* F1-2 isolée lors de cette étude, pourrait exercer un pouvoir antalgique marqué puisque nos données ont montré une baisse significative de l'HSVC dans plusieurs modèles murins de douleur viscérale. La plupart des souches bactériennes probiotiques exercent des effets immunomodulateurs, en réduisant la réponse inflammatoire. Contre toute attente, les résultats obtenus indiquent que la souche F1-2 emprunte une autre voie, impliquant le système nerveux. L'étude plus approfondie du dialogue direct entre la souche F1-2 et le système nerveux suggère l'implication de la bradykinine ou de ses récepteurs dans cette interaction directe « bactérie-neurone ». À notre connaissance, notre étude constitue la première mise en évidence du potentiel antalgique porté par l'espèce *Parabacteroides distasonis*, des résultats aujourd'hui protégés par un **brevet** rédigé au cours de la thèse. Néanmoins, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de confirmer que l'effet neuro-inhibiteur de F1-2 observé *in vitro* soit à l'origine de son potentiel anti-hyperalgique chez la souris.

Les techniques développées au cours de ma thèse ont permis d'étendre l'étude à d'autres espèces bactériennes commensales intestinales et a fait l'objet d'un projet collaboratif entre **NEURODOL**, **GREENTECH** et l'institut **BIOASTER**. L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que d'autres souches bactériennes étaient capables de réduire l'activation de cellules neuronales soumises à diverses stimulations nociceptives, de potentiels candidats qui rejoindront la liste des LBP.

Ce projet m'a permis de mobiliser mes connaissances en microbiologie acquises au cours de mon cursus universitaire ainsi que pendant ma première expérience professionnelle, mais aussi de croiser 2 disciplines : la microbiologie et les neurosciences, un lien central au sein de l'axe de communication microbiote-intestin-cerveau qui suscite un vif intérêt à l'heure actuelle. Ayant apporté les premières preuves de son efficacité et de son innocuité, l'utilisation de la souche F1-2 est aujourd'hui envisagée comme nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement des douleurs abdominales chroniques, un symptôme dont souffrent les patients atteints de pathologies intestinales telles que le SII ou les MICI.



---

## ANNEXES

---

Annexe 1 : Articles scientifiques premier auteur

Annexe 2 : BREVET

Annexes 3 et 4 : Articles de revues premier auteur





## Attenuation of negative effects of senescence in human skin using an extract from *Sphingomonas hydrophobicum*: development of new skin care solution

S. Gervason\*, M. Napoli\*, A. Dreux-Zhiga\*, C. Lazzarelli<sup>1</sup>, S. Garcier<sup>1</sup>, A. Briand<sup>1</sup>, M. Albouy<sup>2</sup>, A. Thepot<sup>2</sup>, J. Y. Berthon\* and E. Filaire\*<sup>3</sup> 

\*GRIENTECH SA, Biopôle Clermont-Limagne, 63360, Saint-Beauzire, France, <sup>1</sup>Deinove, 1682 rue de la Valsiere, 34790, Grabels, France, <sup>2</sup>Labskin Creations, Hôpital Edouard Herriot Bâtiment, 5 Place d'Arsonval, 69003, Lyon, France and <sup>3</sup>INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, Université Clermont Auvergne, F-63000, Clermont-Ferrand, France

Received 6 March 2019, Accepted 23 April 2019

**Keywords:** ageing, psychobiology, self-esteem, senescence, skin, *Sphingomonas*

?

?

?

?



INTERNATIONAL FEDERATION  
OF SOCIETIES OF COSMETIC CHEMISTS

## A Psychobiological Approach for a Positive Skin Aging: Target Senescence Cells to Boost Emotion

Sandie Gervason<sup>1</sup>, Assia Dreux-Zhiga<sup>1</sup>, Justine Demangeon<sup>1</sup>, Caroline Lazzarelli<sup>2</sup>, Jean-Yves Berthon<sup>1</sup>, Edith Filaire<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Greentech, Biopôle Clermont-Limagne 63360 Saint Beauzire, France

<sup>2</sup>Deinove, 1682 rue de la Valsiere, 34790, Grabels, France

<sup>3</sup>University Clermont Auvergne, UMR 1019 INRA-UcA, UNH (Human Nutrition Unity), ECREIN Team, 63000 Clermont-Ferrand, France

**Keywords:** Psychobiology, self-esteem, senescence, *Sphingomonas*

This publication was originally presented as a poster presentation at the 25<sup>th</sup> IFSCC Conference in Milan, Italy, September 30 - October 2, 2019.

?

?

?

SCIENTIFIC PAPER

?

Article

## ***Rhodomirtus tomentosa* Fruit Extract and Skin Microbiota: A Focus on *C. acnes* Phylotypes in Acne Subjects**

Sandie Gervason <sup>1</sup>, Isabelle Metton <sup>2</sup> , Elodie Gemrot <sup>2</sup>, Edwige Ranouille <sup>1</sup>, Gilbert Skorski <sup>2</sup>, Magalie Cabannes <sup>1</sup>, Jean-Yves Berthon <sup>1</sup> and Edith Filaire <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> R&D Department, Greentech, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint Beauzire, France; microbiorecherche@greentech.fr (S.G.); developpement@greentech.fr (E.R.); applications@greentech.fr (M.C.); jeanyvesberthon@greentech.fr (J.-Y.B.)

<sup>2</sup> R&D Department, Phylogene S.A., 62 RN 113, 30620 Bernis, France; i.metton@phylogene.com (I.M.); e.gemrot@phylogene.com (E.G.); g.skorski@phylogene.com (G.S.)

<sup>3</sup> UMR 1019 INRA-UcA, UNH (Human Nutrition Unity), ECREIN Team, University Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

\* Correspondence: edithfilaire@greentech.fr; Tel.: +33-04-73339900

Received: 29 May 2020; Accepted: 1 July 2020; Published: 7 July 2020



## ANNEXE 2

BREVET

### Titre de l'invention : *Parabacteroides distasonis* strain isolated from human feces and application thereof

#### Form 1002 - 1: Public inventor(s)

#### Designation of inventor

User reference: GRH B001 EP1  
Application No:

Public

<b>Inventor</b>	Name: GERVASON, Ms. Sandie Address: 63430 Pont-du-château France The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
<b>Inventor</b>	Name: FILAIRE, Ms. Edith Address: 63730 Mirefleurs France The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
<b>Inventor</b>	Name: BERTHON, Mr. Jean-Yves Address: 63540 Romagnat France The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer
<b>Inventor</b>	Name: CARVALHO, Mr. Frédéric Address: 63000 Clermont-Ferrand France The applicant has acquired the right to the European patent:	As employer

#### Signature(s)

Place: **CHAMPS SUR MARNE**  
Date: **01 April 2022**  
Signed by: **/TOUROUDE Magali/**  
Association: **TOUROUDE & ASSOCIATES**  
Representative name: **TOUROUDE Magali**  
Capacity: **(Representative)**



## Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	10818678	
Application number	EP22166365.1	
File No. to be used for priority declarations	EP22166365	
Date of receipt	01 April 2022	
Your reference	GRH B001 EP1	
Applicant	GREENTECH	
Country	FR	
Title	Parabacteroides distasonis strain isolated from human feces and applications thereof	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdfGRH B001 EP1 - Texte et dessins TQD.pdf (35 p.) BIOM-RECEIPT-1.pdfCertificat d_enregistrement F1-2 (1).pdf (1 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SEQLTXT.txtGRH-B001-EP1-LISTSEQ.txt f1002-1.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=Hélène Coutey 75006	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	01 April 2022, 15:11 (CEST)	
Message Digest	0A:40:CA:97:4C:2C:A3:21:E4:CA:C2:13:69:E3:84:94:74:37:DD:CA	

/European Patent Office/

# ANNEXE 3

Journal of Neural Transmission  
https://doi.org/10.1007/s00702-019-02083-z

NEUROLOGY AND PRECLINICAL NEUROLOGICAL STUDIES - REVIEW ARTICLE



## Microbiota: a novel regulator of pain

Manon Defaye<sup>1</sup> · Sandie Gervason<sup>2,3</sup> · Christophe Altier<sup>1</sup> · Jean-Yves Berthon<sup>2</sup> · Denis Ardid<sup>3</sup> · Edith Filaire<sup>2,4</sup> · Frédéric Antonio Carvalho<sup>3</sup>

Received: 3 July 2019 / Accepted: 16 September 2019  
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

### Abstract

Among the various regulators of the nervous system, the gut microbiota has been recently described to have the potential to modulate neuronal cells activation. While bacteria-derived products can induce aversive responses and influence pain perception, recent work suggests that “abnormal” microbiota is associated with neurological diseases such as Alzheimer’s, Parkinson’s disease or autism spectrum disorder (ASD). Here we review how the gut microbiota modulates afferent sensory neurons function and pain, highlighting the role of the microbiota/gut/brain axis in the control of behaviors and neurological diseases. We outline the changes in gut microbiota, known as dysbiosis, and their influence on painful gastrointestinal disorders. Furthermore, both direct host/microbiota interaction that implicates activation of “pain-sensing” neurons by metabolites, or indirect communication via immune activation is discussed. Finally, treatment options targeting the gut microbiota, including pre- or probiotics, will be proposed. Further studies on microbiota/nervous system interaction should lead to the identification of novel microbial ligands and host receptor-targeted drugs, which could ultimately improve chronic pain management and well-being.

**Keywords** Microbiota · Visceral pain · Microbiota/gut/brain axis · Probiotic treatment

### Abbreviations

ANS	Autonomic nervous system	CNS	Central nervous system
ASD	Autistic spectrum disorder	CP	Chronic prostatitis
CD	Crohn’s disease	CPPS	Chronic pelvic pain syndrome
CGRP	Calcitonin gene-related peptide	CpG	Cytosine guanosine
CHS	Colonic hypersensitivity	DRG	Dorsal root ganglion
CIPN	Chemotherapy-induced peripheral neuropathy	EC	Enterochromaffin cells
		EPM	Extracellular polymeric matrix
		FD	Functional dyspepsia
		FODMAPs	Fermentable oligo-, di-, monosaccharides and polyols
		FMT	Fecal microbiota transplantation
		FPR	Formyl peptide receptor
		GABA	Gamma-amino butyric acid
		GF	Germ-free
		GPR41	G-coupled receptor 41
		HDAC	Histone deacetylase
		HPA	Hypothalamic/pituitary/adrenal
		IC	Interstitial cystitis
		IL	Interleukin
		IBD	Inflammatory bowel disease
		IBS	Irritable bowel syndrome
		LPS	Lipopolysaccharide
		Lypd8	Ly6/Plaur domain-containing 8
		LTA	Lipoteichoic acid

Manon Defaye and Sandie Gervason contributed equally to this work.

✉ Frédéric Antonio Carvalho  
frederic.carvalho@inserm.fr

<sup>1</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Inflammation Research Network, Snyder Institute for Chronic Diseases, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, AB T2N 4N1, Canada

<sup>2</sup> GREENTECH SA, Saint-Beauzire, France

<sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, INSERM U1107, NeuroDol, CRHN Auvergne, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63001 Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup> Université Clermont Auvergne, INRA, Unité de Nutrition Humaine ECREIN, CRNH Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

Published online: 24 September 2019

Springer

MAM	Microbial anti-inflammatory molecule
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide oligomerization domain receptor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PGN	Peptidoglycan
PI-IBS	Post-infectious IBS
PRRs	Pattern recognition receptor
PSA	Polysaccharide A
SCFA	Short-chain fatty acid
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRP	Transient receptor potential channel
TRPA1	Transient receptor potential ankyrin member 1
TRPM3	Transient receptor potential melastatin member 3
TRPM8	Transient receptor potential melastatin member 8
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid member 1
TRPV4	Transient receptor potential vanilloid member 4
UC	Ulcerative colitis
5-HT	5-hydroxytryptamine or serotonin

## Introduction

Pain, which affects millions of people worldwide, is difficult to treat and can affect mood, social and professional life. While acute pain can contribute to a defense mechanism against microbes, fungi or viruses, maladaptive changes in the nervous system can drive the transition to chronic persistent pain post-infection.

Bacteria, archaea, viruses, fungi, protozoa, and helminths that populate our bodies are a thriving dynamic population forming a symbiotic superorganism. Current estimates suggest that approximately  $\sim 10^{14}$  microbes live on or in the human body with the number of microbial cells outnumbering the human cells (Sender et al. 2016). The greatest density of microbes resides in our gastrointestinal tract, particularly the colon part, which has received attention. The recent surge of gut microbiome-related studies over the last decade results from the rapid advancement of culture-free, affordable DNA sequencing technologies to identify commensal species within a given microbial community as well as the increased accessibility to germ-free (GF) animals, predominantly mice, enabling us to shape and control microbial reconstitution (Lozupone et al. 2012). These studies have highlighted the microbiota/gut/brain as a central axis in the development of central nervous system (CNS) and revealed an unexpected role of the gut microbiota on many

aspects of brain function (Cryan and Dinan 2012). Using GF mice, numerous studies have shown that these mice in adulthood have marked changes in neurotransmitter levels, plasticity-related proteins, increased stress response, changes in anxiety and social behavior and also in pain perception (Luczynski et al. 2017).

It is now widely described that interaction in the microbiota/gut/brain axis is bidirectional. Efferent nerves of the central nervous system (CNS) modulate the gastrointestinal tract including microbiota via the sympathetic and parasympathetic branches of the autonomic nervous system (ANS), as well as via the hypothalamic/pituitary/adrenal (HPA) axis (Crowell 2004). These pathways can influence the enteric microbiota indirectly by modifying its environment and directly via a large number of signaling molecules including immunoregulatory neuropeptides with antimicrobial properties (Mayer et al. 2015). Afferent GI nerves from the host detect quorum-sensing molecules produced by microbes to communicate with one another (Janssens et al. 2018). These molecules include short-chain saturated fatty acids (SCFA), metabolites of bile acids, and neuroactive substances such as gamma-aminobutyric acid (GABA), tryptophan precursors and metabolites, serotonin, and catecholamines. It also includes cytokines released during the immune response to microbes, which can specifically signal to the host via receptors on local epithelial and mesenchymal cells within the gut. These factors can also signal via neurocrine pathways (vagal and possibly spinal afferences) and endocrine mechanisms to target well beyond the gastrointestinal tract, including vagal afferents in the portal vein and receptors in the brain (Mayer et al. 2015). Some of these signaling mechanisms can occur in the presence of an intact epithelium but are likely enhanced and altered in the context of increased intestinal permeability induced by stress (Da Silva et al. 2014) or mucosal inflammation (Hsiao et al. 2013).

Alterations of the microbiota/gut/brain axis have been described in chronic intestinal pathologies such as irritable bowel syndrome (IBS) or inflammatory bowel disease (IBD). These intestinal pathologies are also associated with cognitive disorders, an anxio-depressive phenotype, stress but also, at the intestinal level, alterations of transit and permeability, inflammation, as well as an infectious etiology and dysbiosis (Ringel and Ringel-Kulka 2015). Accumulating work suggest indeed a dominant role of the intestinal microbiota in the appearance of these two types of pathologies. According to a recent study, intestinal dysbiosis is present in 73% of IBS patients, in 70% of IBD patients (naive treatment) and in 80% of patients with quiescent IBD compared to only 16% of healthy subjects (Casén et al. 2015). Abdominal pain associated with colonic hypersensitivity (CHS) is also an important symptom of IBD and IBS patients, strongly affecting the patients' quality of life (Piche

et al. 2010). One hypothesis about chronic abdominal pain is that intestinal dysbiosis could significantly contribute to the initiation and the maintenance of the observed symptom.

In addition to intestinal disorders, increasing evidence suggests a correlation between dysbiosis and neurological diseases like Parkinson's or Alzheimer's disease (Dutta et al. 2019; Fox et al. 2019; Rueda-Ruzafa et al. 2019). Recent works indicate that specific microbial metabolites drive neuroinflammatory processes, as well as motor and cognitive deficits in mouse models of Alzheimer's or Parkinson's disease, illustrating the impact of microbiota on brain functions. This could provide exciting research interests in the field of microbiota/gut/brain axis and neurological diseases. Nevertheless, in contrast to chronic intestinal pathologies, only a very few studies seem to link gut dysbiosis and bacteria-derived metabolites to pathological pain including neurological diseases without a priori colonic involvement, like autism.

In this review, we will focus on preclinical and clinical studies highlighting an impact of microbiota on pain perception in a disease context. On the other hand, we will detail by which pathogen-associated metabolite, the microbiota may activate nociceptors and so participate in pain pathway activation.

## Modification in microbiota associated with chronic pain

### Gut microbiota

Gut microbiota regulates many aspects of host physiology including metabolism, immune system maturation, brain development and behavior (Sekirov et al. 2010). Shifts in intestinal microbial composition (dysbiosis) and function may lead to the development of diseases. Among them are gastrointestinal disorders such as IBS and IBD, but also extra-intestinal pathologies such as fibromyalgia, cancers, metabolic syndrome, rheumatic diseases, allergic and atopic disease, heart disease and neuropsychiatric diseases (Ahmadmehrabi and Tang 2017; Cryan and Dinan 2012; Festi et al. 2014; Sekirov et al. 2010; Van de Wiele et al. 2016). Many of these studies have focused on the pathological mechanisms associated with dysbiosis. We will present the current state of knowledge of the functional relationship between microbes and pain.

### Visceral pain

In the last decade, preclinical models have been used to determine the involvement of the intestinal microbiota in visceral pain. The application of a psychological or physical stress either chronic or in early life is a key factor in the

development of visceral pain. Several studies have shown that GF mice (raised in a sterile environment from birth) exhibit visceral hypersensitivity accompanied by an increase in Toll-like receptor expression (TLR1-9) and cytokine levels such as interleukin (IL) 6, IL-10 or tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in spinal cord. However, these changes were normalized by postnatal colonization with conventional microbiota (Luczynski et al. 2017; O'Mahony et al. 2013; Sudo 2012; Sudo et al. 2004). These findings indicate that commensal intestinal microbiota is necessary for balancing the excitability of colonic sensory neurons.

Likewise, antibiotics administered in early life induce visceral hypersensitivity in adulthood. This is associated with alterations in ion channels and receptors such as decrease in the transient receptor potential vanilloid member 1 (TRPV1), the  $\alpha$ -2A adrenergic receptor, and cholecystokinin B receptor in the spinal cord (O'Mahony et al. 2014). However, in adult, antibiotic effects are controversial. Studies have shown that antibiotic treatment decreased visceral hypersensitivity induced by intraperitoneal acetic acid injection or intracolonic capsaicin infusion in mice, whereas naive rats displayed hyposensitivity (Aguilera et al. 2015; Hoban et al. 2016). Another study showed that antibiotic treatment induced visceral hypersensitivity in association with local immune response (Verdú et al. 2006).

Strikingly, visceral hypersensitivity can be transferred in GF rats by fecal microbiota transplantation (FMT) from IBS patients. Although colorectal compliance, epithelial paracellular permeability and density of colonic mucosal mast cells remained normal, recipient mice exhibited visceral hypersensitivity to colorectal distension and increased hydrogen sulfide production known to promote nociceptive behavior following colorectal infusion (Crouzet et al. 2013; Matsunami et al. 2009).

Various studies demonstrate the efficacy of probiotic administration on visceral hypersensitivity. In fact, *Lactobacillus paracasei* NCC2461 in mice, *Faecalibacterium prausnitzii* and the probiotic mix VSL#3 in rats decreased the maternal separation stress-induced visceral hypersensitivity (Distrutti et al. 2013; Eutamene et al. 2007; Miquel et al. 2016; O'Mahony et al. 2012). Similarly, in a restraint stress-induced visceral hypersensitivity, *Bifidobacterium lactis* CNCM I-2494 attenuated the nociceptive response (Agostini et al. 2012). VSL#3 also prevented inflammation-induced visceral hypersensitivity after intracolonic instillation of 4% acetic acid (Dai et al. 2012). On the other hand, *Bifidobacterium infantis* 35624 ameliorated visceral hypersensitivity in the trinitrobenzene sulphonate-induced (TNBS) model of colitis in rats and blunted nociceptive responses as described for *Lactobacillus paracasei* NCC2461 and *Lactobacillus reuteri* (Johnson et al. 2011; Kamiya et al. 2006; McKernan et al. 2010; Verdú et al. 2006).

**Irritable bowel syndrome (IBS)** Irritable bowel syndrome (IBS), the leading cause of consultation in gastroenterology, is an intestinal functional disease with a global prevalence of 11.2% in 2016, higher in Western countries (Enck et al. 2016). This intestinal disorder is characterized by frequent abdominal pain associated with changes in stool consistency and frequency, in the absence of changes in bowel structure. IBS is a multifactorial pathology whose pathogenesis is not yet fully understood. Several types of functional alterations in visceral sensitivity, brain function, intestinal motility or secretory function have been reported in IBS patients. The multifactorial etiology of IBS makes it impossible to envision the development of a single treatment applicable to all patients. The current treatments are symptomatic and they will target, according to the patients, the modifications of the transit, the bloating and/or the pain. The usual therapy also varies according to the severity of the syndrome but generally remains largely insufficient regarding the management of pain and associated CHS.

**Intestinal dysbiosis associated with IBS:** The concept that alterations in the gut microbiota composition might be relevant to IBS arose from observations that symptoms of IBS often developed after an infection (Lee et al. 2017) and some data suggest that the colonic microbiome composition and function is altered in IBS patients in comparison with healthy controls (Enck and Mazurak 2018).

The role of certain pathogens in the development of post-infectious (PI) IBS is now well established. In fact, more than 50 years ago, infectious enteritis was identified as a risk factor for IBS. The prevalence of PI-IBS varies between 4 and 36% and the symptoms especially visceral pain may persist up to 10 years after gastrointestinal infection (Klem et al. 2017). Bacteria such as *Shigella* spp., pathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter jejuni*, viral (Norovirus) enteritis, or protozoa parasite as *Giardia duodenalis* or potentially *Blastocystis* have been found to be linked to PI-IBS (Cremon et al. 2014; Kowalczyk et al. 2014; Nielsen et al. 2014; Nourrisson et al. 2014; Porter et al. 2012; Rostami et al. 2017; Tan 2008; Wensaas et al. 2012; Youn et al. 2016; Zanini et al. 2012). In a recent meta-analysis, the rate after infectious enteritis was higher with parasite (+40%) than bacterial (+14%) or viral infections (+4%) (Klem et al. 2017). Virulence of the pathogen but also the duration of infection is also a risk factor in PI-IBS (Lee et al. 2017).

Various studies described intestinal dysbiosis in IBS patients. While data are heterogeneous, the gut microbiota appears to play an important role in IBS pathogenesis. The modulation of the ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* is an indicator of changes in the microbiota composition. In the literature, studies described an increase or a decrease in this ratio in IBS patients (Jalanka-Tuovinen et al. 2014; Jeffery et al. 2012; Pozuelo et al. 2015; Tana et al. 2010; Tap et al. 2017). The controversial data may be explained by the primers

used for the amplification of a variable region of the 16S rRNA gene, the DNA extraction method, the small number of patients with IBS included in the study, the subtype of IBS diagnosed or the severity of the pathology. Globally, studies have shown an increase in the relative abundance of pro-inflammatory bacteria including the family *Enterobacteriaceae* and a reduction in the relative abundance of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* (Duboc et al. 2012; Kerckhoffs et al. 2009; Parkes et al. 2012; Zhuang et al. 2017). Interestingly, the species *Faecalibacterium prausnitzii* and the genus *Bifidobacterium*, the families of *Ruminococcaceae* and *Erysipelotrichaceae*, and the order *Clostridiales* are SCFA-producing bacteria known to be involved in intestinal homeostasis (Rooks et al. 2014). Various studies have shown a reduction in the relative abundance of these bacteria in IBS patients (Lyra et al. 2009; Pozuelo et al. 2015; Rigsbee et al. 2012; Saulnier et al. 2011; Tana et al. 2010; Zhuang et al. 2017). Moreover, studies shown modulation of the quantity of SCFAs in IBS patients (Farup et al. 2016; Gargari et al. 2018; Treem et al. 1996), but the results are sometimes contradictory (Tana et al. 2010). While some studies described a reduction in SCFA levels, an increase in these levels was observed correlated with an increase in some SCFA-producing bacteria such as *Roseburia*, *Blautia* and *Veillonella* (Rajilić-Stojanović and de Vos 2014).

In addition, changes in the relative abundance of other type of bacterial were demonstrated in other studies. Increase in the relative abundance of *Ruminococcus* including *R. gnavus* and *R. torques* which are able to degrade mucus, *Bacteroides* or *Streptococcus* can lead to IL-6 production (Jalanka-Tuovinen et al. 2014; Jeffery et al. 2012; Lyra et al. 2009; Malinen et al. 2005; Parkes et al. 2012; Ponnusamy et al. 2011; Rigsbee et al. 2012; Ringel and Ringel-Kulka 2015; Saulnier et al. 2011; Tana et al. 2010). More recently, an increase in the relative abundance of the genus *Prevotella* has been associated with the development of IBS (Su et al. 2018). Interestingly, the relative abundance of sulfate-reducing bacteria is enhanced in IBS patients (Crouzet et al. 2013). In addition, methane has been associated with the development of IBS. The production of methane is limited to the reign of the archaea, particularly *Methanobacteriales* in humans and the increase in methane levels in patients with IBS (Kim et al. 2012; Pimentel et al. 2006; Tap et al. 2017) is characterized by the presence of *Methanobacteriales* associated with increased level of *Clostridiales* resulting in a slower transit (Falony et al. 2016; Jahng et al. 2012; Pimentel et al. 2006; Tap et al. 2017; Vandeputte et al. 2016). Strikingly, the severity of the symptoms is positively correlated with the presence of these archaea and an increase in the abundance of bacteria belonging to the order of *Clostridiales* or genus *Prevotella* (Rodríguez-Janeiro et al. 2018).

More recently, fecal fungi were examined in IBS patients with or without visceral hypersensitivity compared to healthy individuals (Botschuijver et al. 2017). The fecal mycobiota of healthy individuals consists of 57% of the species *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. This percentage rises to 76% in hypersensitive and to 83% in normal-sensitive patients, indicating that IBS patient present a significant increase in the abundance of these two strains of yeast regardless of their visceral sensitivity. In addition, the fungal diversity is decreased among IBS patients compared to control subjects. In this study, animal experiments revealed that CHS induced during neonatal stress could be reduced by the use of antifungals (Botschuijver et al. 2017). These results therefore suggest the contribution of certain fungal communities in eliciting IBS symptoms such as CHS associated with chronic abdominal pain. However, further studies are needed to confirm these results and also evaluate the possible disturbances of the mycobiota according to the different subtypes of IBS.

**Treatment by modulation of the microbiota composition:** Data from previous studies suggest that alterations in the gut microbiota composition and function may induce or exacerbate existing symptoms. This then raises the question of whether antibiotics, or other related interventions, can be used to modulate the gut microbiome and thus improve IBS symptoms. A recent meta-analysis identified 4017 citations (Ford et al. 2018). Authors showed that data for prebiotics and symbiotic studies were controversial. With probiotics, some combinations, or specific species and strains appeared to have beneficial effects on abdominal pain (Didari et al. 2015; Ford et al. 2018; Rondanelli et al. 2017), but the heterogeneity of studies by the strain or the quantity used and duration of the treatment does not allow drawing definite conclusions about their efficiency. Moreover, host and microbiome features contribute to the efficiency of probiotics and may explain differences between studies (Zmora et al. 2018).

Moreover, few trials using antibiotics like rifaximin showed modest efficiency in improving symptoms. Nevertheless, there is a growing interest in fecal microbiota transplantation (FMT) therapy for several gastrointestinal disorders. While data for FMT in IBS patients were sparse (Xu et al. 2019), FMT therapy was successful in treating *Clostridium difficile* infection, suggesting that future work is warranted to demonstrate the therapeutic value of microbiota reconstitution.

The majority of IBS patients had worsening symptoms after eating certain foods that were rich in carbohydrates, lipids and had a high calorie count (Böhn et al. 2013; Le Nevé et al. 2013; Posserud et al. 2013). The first recommendations are to eat “healthier”, meaning to avoid or limit the consumption of alcohol, caffeine, spicy or high-fat foods, but also to limit the size and number of meals (Simrén and

Tack 2018). When the symptoms are not reduced with this “healthier” diet, it is then proposed to follow a low-fermentable oligo-, di-, monosaccharides and polyols (FODMAPs) diet (Simrén and Tack 2018). Clinical studies reported a reduction in symptoms in IBS patients with a diet depleted in FODMAPs (Halmos et al. 2014; Pourmand and Esmailzadeh, 2017; Shepherd et al. 2008; Staudacher et al. 2017; Zahedi et al. 2018). So far, most of the studies were conducted over short periods (up to 4 weeks) but a low FODMAPs diet rather than a complete elimination may be effective in the longer-term treatment (O’Keefe et al. 2018; Whelan et al. 2018). In addition, a depleted regime in FODMAPs may favor changes in the composition of the intestinal microbiota (Schumann et al. 2018). Thus, this scheme can be used in combination with probiotics to preserve gut microbiota and prevent in particular the reduction in the abundance of the genus *Bifidobacterium*, characteristic of IBS patients (Staudacher et al. 2017).

A gluten-free diet has also been mentioned in the treatment of IBS symptoms (Biesiekierski et al. 2011). Evidence is emerging about the decrease in activation of immune system in a gluten-free diet (Uhde et al. 2016). However, no direct link has been established between the development of symptoms associated with IBS and gluten.

**Inflammatory bowel disease (IBD)** Pain is one of the most common causes of disability and impaired quality of life in IBD, which regroups Crohn’s disease (CD) and ulcerative colitis (UC) (Lönnfors et al. 2014). IBD has a prevalence of 322 cases per 100,000 people worldwide and 505 cases per 100,000 people in Europe. They are characterized by acute intestinal inflammatory flares of extremely variable duration and frequency, interspersed with more or less long periods of remission, spontaneous or under the influence of treatments. However, despite successful treatment of active disease, the symptoms of abdominal pain are out of proportion with the observed degree of inflammation (Long and Drossman 2010). These symptoms, known as IBS-like symptoms, are present in approximately 40% of IBD patients with a higher prevalence in CD than in UC patients (Halpin and Ford 2012). These pathologies present a multifactorial and complex etiology comprising immune system, microbiota and environmental factors on genetically susceptible individuals (Wallace et al. 2014). Indeed, genetic susceptibility may lead to an excessive immunological response to the gut microbiota or an imbalance in the microbiota composition resulting in environmental stress that may trigger a pathological response from the immune system (Strober et al. 2007).

**Intestinal dysbiosis associated with IBD:** Clinical studies have shown potential imbalance of the gut microbiota in IBD patients, with an overall loss of bacterial richness, a decrease of *Firmicutes* and an increase of *Proteobacteria* (Baumgart

et al. 2007; Frank et al. 2007; Manichanh et al. 2006; Ott et al. 2004; Sokol et al. 2006). However, like for IBS, these studies varied in their design resulting in sparse results. A recent meta-analysis described a role of the gut microbiota in the activity of IBD. Indeed, compared to patients in remission, active IBD had lower abundance of *Clostridium coccooides*, *F. prausnitzii* and *Bifidobacterium*. Subgroup analyses showed a difference in all four bacteria between patients with UC classified as active or in remission. Patients with active CD had fewer *C. leptum*, *F. prausnitzii* and *Bifidobacterium*, but not *C. coccooides*.

Like with IBS patients, IBD patients display fungal dysbiosis characterized by an increased *Basidiomycota/Ascomycota* ratio, a decreased proportion of *Saccharomyces cerevisiae* and an increased proportion of *Candida albicans* compared with healthy control (Chehoud et al. 2015; Iliev et al. 2012; Sokol et al. 2017). Authors suggested that the inflammatory environment of CD favors the expansion of fungi over bacteria. However, studies of the mucosa-associated fungal composition have yielded similar variable results (Mukhopadhyaya et al. 2015; Ott et al. 2008).

**Treatment by modulation of the microbiota composition:** While the anti-inflammatory effect of microbiota manipulation was largely studied, only few studies focused on its analgesic effect. One study reported improvement of abdominal pain by antibiotics (Castiglione et al. 2003), but microbiota composition has not been studied.

Fermentable polysaccharide supplement known to have positive prebiotic properties was given to participants. Reduced abdominal pain was reported with tolerance, but disease status of patients was not reported. In other study, abdominal pain was reduced in CD patients after the consumption of used kefir, a source of carbonated and fermented milk product, containing lactic acid bacteria (Yilmaz et al. 2019).

The low FODMAPs diet has an important role in IBS management and so it has received considerable interest in its application to those with IBD. A recent meta-analysis support that a low FODMAPs diet is beneficial for reducing gastrointestinal symptoms such as abdominal pain in patients with quiescent IBD (Zhan et al. 2018).

#### Other pathologies associated with painful gastrointestinal disorders

**Functional dyspepsia:** Functional dyspepsia (FD) is characterized by troublesome early satiety, fullness, or epigastric pain or burning. It can easily be overlooked as the symptoms overlap with gastro-esophageal reflux disease and IBS (Talley 2017). The pathophysiology of functional dyspepsia is not completely understood. As described for IBS, post-infectious gastroenteritis was recently identified as a risk factor for FD (Talley and Ford 2016). It has been hypothesized that the site of infection determines the symptom (Talley 2017). Indeed, infection in the small bowel may

lead to intestinal hypersensitivity-related FD, while colon infection may lead to IBS (Spiller et al. 2010).

Chronic infection is also a risk factor for FD. Meta-analyses of randomized controlled trials established that *H. pylori* eradication had beneficial effects in controlling the symptoms of functional dyspepsia (Du et al. 2016; Suzuki and Moayyedi 2013). There is evidence that the duodenal microbiome is altered in FD and antibiotic therapy may reduce the symptoms (Igarashi et al. 2017). Rifaximin appears effective in FD but the effect on composition of the intestinal microbiota was not discussed (Tan et al. 2017; Yoon et al. 2018). Probiotics can also treat FD through the normalization of microbiota (Igarashi et al. 2017; Nakae et al. 2016; Takagi et al. 2016).

**Infantile colic:** Infantile colic is a behavioral syndrome characterized by excessive and inconsolable crying without identifiable cause during the 1st month of life (Daelemans et al. 2018). There is accumulating evidence that the intestinal microbiota in colicky infants differs from healthy controls. In some studies, intestinal microbiota of colicky infants is characterized by decrease in bacterial richness and decrease in the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, while Gram-negative bacteria are increased (Savino et al. 2004; de Weerth et al. 2013). Luminal contents from colicky infants lead to visceral hypersensitivity in mice compared with non-colicky infants (Eutamène et al. 2017). While it is challenging to assess pain in infants, one study reported that manipulation of microbiota using probiotic or prebiotic reduced crying-associated pain (Pärty et al. 2013; Szajewska and Dryl 2016).

**Colonic diverticulosis:** Colonic diverticulosis is characterized by protrusions of the mucosa through weak areas of the colonic musculature. This disease occurs in up to one-third of people over the age of 60 years and in most cases does not generate disabling symptoms (Stollman and Raskin 2004). However, in 10–25% of subjects, colonic diverticula are associated with abdominal pain and changes in bowel habit.

Alterations in the gut microbiota composition have been proposed as a potential etiological factor involved in the pathogenesis of diverticular disease and diverticulitis (Choung et al. 2011). While few studies have found a link between gut microbiota and symptoms, Barbara et al. showed that symptomatic patients displayed depletion of beneficial bacteria such as *Clostridium* cluster IV, *Clostridium* cluster IX, *Fusobacterium*, and *Lactobacillaceae* compared with asymptomatic patients (Barbara et al. 2017). Moreover, a recent study reported that abdominal pain was strongly correlated with fecal dysbiosis (Kvasnovsky et al. 2018).

**Autism:** Autism is a neurodevelopmental disorder characterized by impaired social interaction, verbal and non-verbal communication, and repetitive behavior (Lai et al. 2014).

In addition to cognitive aspects, autistic spectrum disorder (ASD) individuals can suffer from gastrointestinal problems such as abdominal discomfort, pain and gas distension (Holingue et al. 2018). The cause of gastrointestinal dysfunction in the ASD population is unclear. Altered microbiome–gut–brain pathways have been reported in ASD and may contribute to symptoms by changing microbiota composition. Moreover, some studies have reported higher oral antibiotic use in ASD children than typical children (Konstantareas and Homatidis 1987; Niehus and Lord 2006). Administration of antibiotics may disrupt intestinal microbiota and lead to gastrointestinal dysfunction commonly reported in ASD populations. Differences in the microbiota composition have been reported in several studies (De Angelis et al. 2013; Finegold et al. 2010; Kang et al. 2013; Wang et al. 2013). In addition, Luna et al. identified distinctive mucosal microbial signatures in biopsies from ASD children with functional GI disorders (Luna et al. 2017).

#### Extra-intestinal pain: the chemotherapy-induced pain

Chemotherapeutic drugs induce peripheral neuropathy in 30% of patients under treatment (Seretny et al. 2014). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is characterized by pain lasting months to years, which prevent patients from receiving adequate chemotherapy dosages (Hershman et al. 2014). In recent studies, the involvement of the intestinal microbiota in the tumor-killing effect of chemotherapeutic drugs has been described (Viaud et al. 2013). However, the association between intestinal microbiota with the incidence and progression of CIPN has rarely been investigated. Shen et al. showed that oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia was reduced in both mice pretreated with antibiotics and germ-free mice (Shen et al. 2017). This protection was reversed after colonization in germ-free mice. Reciprocally, there is evidence that chemotherapy can change the composition of microbiota (Stojanovska et al. 2018).

#### Urinary microbiota

The urinary tract is not sterile and possesses a complex microbiota that is regulated by various factors. Dysbiosis in the lower urinary tract can cause symptoms of interstitial cystitis, urinary urge incontinence, and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (Magistro 2019).

#### Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome

Chronic prostatitis (CP)/chronic pelvic pain syndrome (CPPS) are chronic conditions characterized by pain or discomfort with significant impact on quality of life (Krsmanovic et al. 2014). CP/CPPS patients display a higher

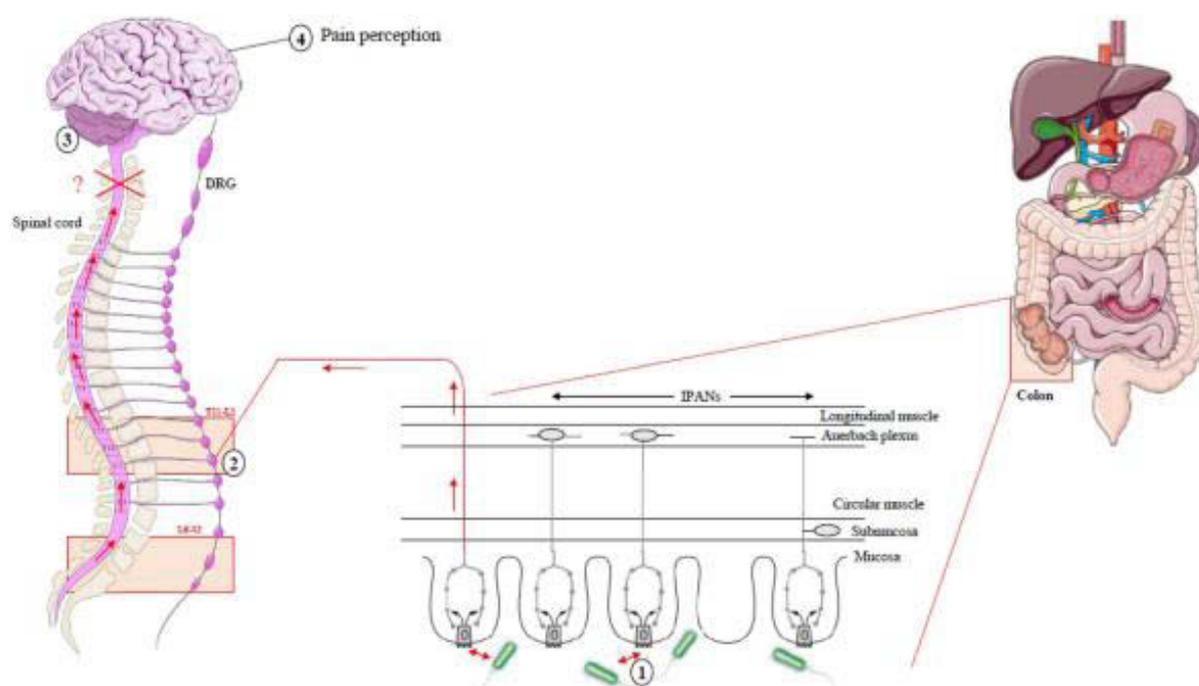
bacterial richness accompanied by a higher abundance of *Clostridia* compared with healthy controls resulting in predicted perturbations in functional pathways such as sporulation chemotaxis and pyruvate metabolism (Shoskes and Macoska 2017). Moreover, the prevalence of fungi (*Candida* and *Saccharomyces* sp.) is significantly greater in women who report a flare compared to those who do not (Nickel et al. 2016). About the gut microbiota, the bacterial richness is decreased in CP/CPPS patients with a significant decrease in the abundance of *Prevotella* (Shoskes et al. 2016).

#### Interstitial cystitis

Interstitial cystitis (IC) is defined by chronic pain associated at least with one additional symptom such as worsening pain with bladder filling or urinary frequency. IC patients harbor differences in the composition of midstream urine but also in the gut microbiota composition. Urinary microbiota of IC patients is characterized by a decrease in the bacterial richness accompanied by a higher abundance of the bacterial genus *Lactobacillus* and a lower abundance of *Corynebacterium* (Abernethy et al. 2017; Nickel et al. 2019; Siddiqui et al. 2012). Studies also described an improvement of symptoms after the eradication of *Lactobacillus* in the IC urine (Darbro et al. 2009). These results suggest that *Lactobacillus* impacts symptom severity, but the role of this genus in IC has still not been determined. On the other hand, a study described a reduction in abundance of *E. sinensis*, *C. aerofaciens*, *F. prausnitzii*, *O. splanchnicus*, and *L. longiformis* in the gut microbiota composition compared to healthy controls (Braundmeier-Fleming et al. 2016).

#### Interactions between nervous system and bacteria

Chronic pain is a maladaptive response of the nervous system to inflammation or injury. In fact, pain can be induced by bacterial infection resulting from the dynamic interactions established between pathogens and the host (White 2009). It is generally accepted that pain sensation is related to inflammation pathway. However, different pathways can be involved in the sensation of pain: on the one hand, it can be induced by the immune pathway after the recognition of pathogen-associated molecular pattern (PAMPs), on the other hand, a crosstalk between microbial agent and the nervous system can lead to pain sensitization. Nociceptors are specialized sensory neurons, which detect potentially damaging stimuli to protect the host by eliciting pain and aversive behaviors (Fig. 1). To achieve this, nociceptors that have cell soma in dorsal root ganglion (DRG) propagate action potentials from the periphery to the spinal cord where it is integrated and transmitted to the cerebral cortex. Five



**Fig. 1** Implication of gut microbiota in pain perception. (1) Gut microbiota can modulate pain perception via constitutive compounds and metabolites secreted. (2) Peripheral nociceptive signals are relayed by dorsal root ganglion (DRG). Axons of these neurons

innervate multiple layers of the intestine and synapse with spinal cord. Message transmission is insured by spinal cord until the brain (3) where pain perception is transduced (4). IPANs intrinsic primary afferent neurons

years ago, it was found that bacterial products could activate nociceptors to cause pain. *Staphylococcus aureus* was shown to induce pain in mice by activating nociceptors via *N*-formyl peptides and the pore-forming toxin  $\alpha$ -haemolysin (Chiu et al. 2013). In this respect, we can consider pain perception as a complex network between immune cells and the nervous system (Ren and Dubner 2010). Indeed, it has been found that receptors of immune cells and nervous cells are shared. In fact, TLR3, TLR7 and TLR9 are expressed by human dorsal root ganglia neurons and have both direct and indirect effects on pain initiation and regulation (Qi et al. 2011). However, when the communication between neurons, non-neuronal cells and immune cells is disrupted, it can result in a state of hypersensitivity.

Data from many clinical studies suggest that certain probiotic bacterial strains have the potential to modulate abdominal pain in case of IBS (Didari et al. 2015; Hungin et al. 2013; Moayyedi et al. 2010). It is the case of the strain *Escherichia coli* Nissle 1917 which is able to produce a lipopeptide C12AsnGABAOH and have analgesic properties. This compound is able to pass the epithelial barrier and to activate GABA<sub>B</sub> receptor (Pérez-Berezo et al. 2017). However, most of the time, data are contradictory and the mechanisms implied are not well understood. Indeed, it is

difficult to compare data because of variable parameters (dose, mode of administration, probiotic strain, etc.) with different specific probiotics which have different effects on different patients. Therefore, probiotics constitute an interesting field of investigation, although it will be challenging in terms of study design. The comprehension of specificity of pathogen-derived molecules and the mechanisms of their detection by the nervous system is just at its beginning. Besides representing new insights of the study, a better comprehension of mechanisms involved in the modulation of pain perception may contribute to finding novel therapeutic strategies.

#### Indirect interaction between bacteria and the nervous system through immune activation

It is well accepted that pathogens can interact with sensory neurons through indirect mechanisms involving immune response. Detection of a pathogen and the initiation of a rapid defensive response constitute the principal challenge for the host (McCusker and Kelley 2013). Immune cells constitute the first line of host defense against microbial infection and the recognition by TLRs leads to the production of pro-inflammatory mediators (cytokines and chemokines)

that can finally induce sensory neurons activation and pain perception (Liu et al. 2012). TLRs are transmembrane glycoproteins belonging to PRRs (pattern recognition receptors) and consisting of two domains: an extracellular domain with leucine-rich repeat motifs and a toll/interleukin-1 receptor (TIR) signaling domain. These receptors belong to two different groups according to their localization in the cell: plasma membrane with TLR1, TLR2, TLR4-6 and TLR11 and endolysosomal membrane for the others (Kang et al. 2016). Activation of immune response can take place after recognition of PAMP localized at the surface of microorganisms. PAMPs are relatively conserved constituents of the cell wall of microorganisms including viral and bacterial nucleic acids, peptidoglycan (PGN), lipoteichoic acid (LTA), lipoproteins, lipopolysaccharides (LPS) (Medzhitov 2007) and flagellin as well as glucans, mannans, chitins and proteins derived from fungal cell wall (Kumar et al. 2009). The bacterial cell wall component PGN is a good example of PAMP which can be recognized by immune cells and initiate immune response. PGN, a peptide-crosslinked sugar polymer, constitutes the major element of the cell membrane both in Gram-positive and Gram-negative bacteria. The immune system can recognize both intact PGN and its fragments thanks to specific receptors belonging to TLR, TLR2 (Wolf and Underhill 2018), NOD1 (nucleotide oligomerization domain receptor 1) and NOD2 which trigger the production of pro-inflammatory cytokines and the recruitment of neutrophils cells to the site of infection (Inohara et al. 2005). TLR2 may recognize also LTAs present in Gram-positive bacteria (Wolf and Underhill 2018). The pathway implicated in the recognition of LPS by TLR is well understood. Indeed, LPS, a characteristic component of Gram-negative bacteria, is one of the best studied immunostimulatory components and is recognized by TLR4 (Lu et al. 2008). The recognition by TLRs induces activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and transcription factors such as nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) contributing to the induction of type I interferon or proinflammatory cytokines and chemokines by macrophages (Kawai and Akira 2010). *N*-formyl peptides, motifs found on several bacteria represent another potential ligand that can induce immune response via their recognition by formyl peptide receptors (FPRs). In fact, FPRs are expressed by innate immune cells, and their activation lead to the recruitment of leukocytes and the production of pro-inflammatory cytokines to fight against microbial infection (Rooks and Garrett 2016). Finally, the innate immune system detects flagellated bacteria via TLR5. This activation leads to the release of antimicrobial peptides and secretion of chemokines that induce a recruitment of neutrophils. Flagellin is also recognized by NOD-like receptor family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4). This receptor activates inflammasome complex causing the death of infected cells (Ley and Gewirtz 2016). This is a strategy to control

the level of flagellated bacteria in the gut. To limit the access to the intestinal mucosa, colonic epithelial cells release Ly6/Plaur domain-containing 8 (Lypd8) that blocks motility of bacteria in the colon and constitute a mean to maintain microbiota homeostasis (Hsu et al. 2017; Ley and Gewirtz 2016; Okumura et al. 2016). Lypd8 is a highly glycosylated GPI-anchored protein highly and selectively expressed on the mucosal surface of the large intestine (Okumura and Takeda 2018). It was shown that Lypd8 inhibited motility of bacteria such as *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* and limited bacterial invasion of the colonic epithelia (Okumura et al. 2016). Many others compounds, produced by gut microbiota, can modulate pain perception via the modulation of the immune response. MAM (for Microbial Anti-inflammatory Molecule) is a protein (15KDa) which has been discovered in the supernatant of *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn disease, and is able to inhibit the NF- $\kappa$ B pathway in several intestinal cells lines (Quévrain et al. 2016). This strain stimulated lot of interest because several phylotypes are able to produce extracellular polymeric matrix (EPM) with immunomodulatory effects through TLR2 pathway and can modulate the release of IL-12 and IL-10 (Rossi et al. 2015). Many members of the gut microbiota produce metabolites that can modulate immune response among them, SCFAs or neurotransmitters. It is important to consider neuron-immune interactions in pain and inflammation. The immune system is a major player in pain by releasing mediators that can sensitize nociceptor function. This response is mediated by the activation of specific receptors and ion channels localized at the nerve terminal of the nociceptors. Resident and infiltrating immune cells like neutrophils, mastocytes and macrophages produce cytokines, lipids, proteases, histamine, serotonin (5-HT) and growth factors. The recognition of these pro-inflammatory molecules via specific mechanism of transduction that implicate TRPV1 and transient receptor potential ankyrin member 1 (TRPA1) channels, among other leads to neuron depolarization, action potential propagation along the afferent pain pathway (Pinho-Ribeiro et al. 2017).

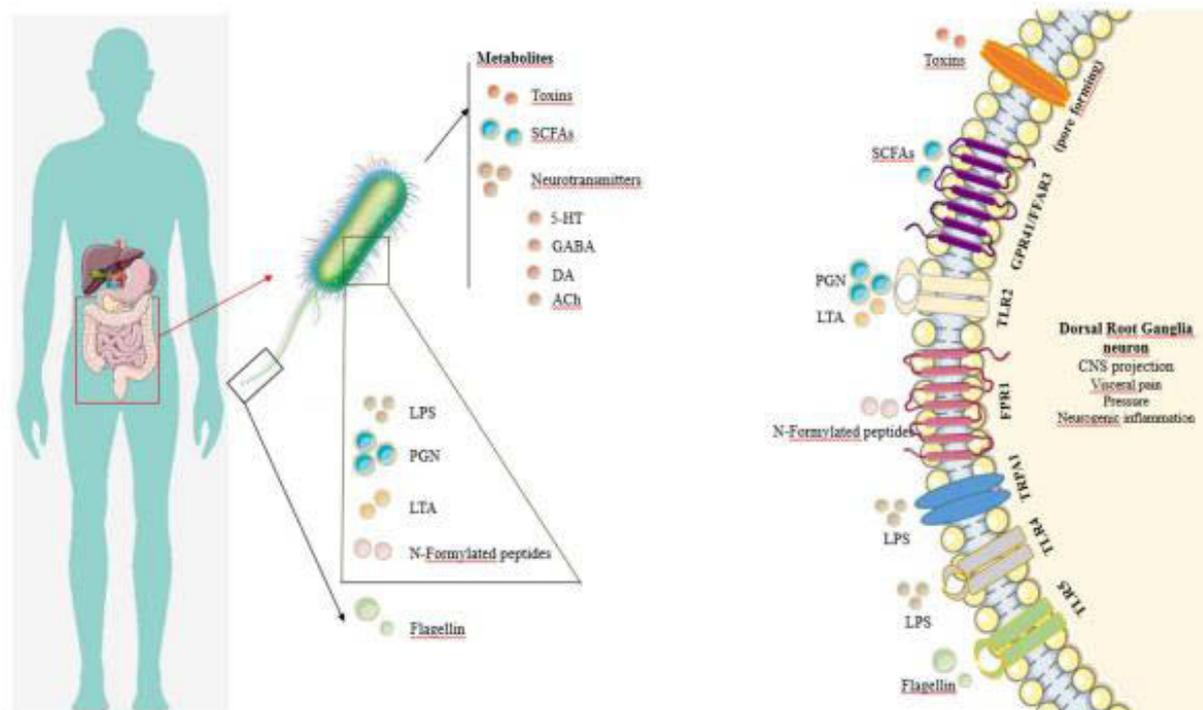
### Possible direct interaction between the gut microbiota and nociceptors

#### Interactions by constitutive elements

Many barrier tissues including the skin, gastrointestinal tract, genitourinary tract and respiratory tract are innervated by the somatosensory nervous system. Perception of pain is mediated by nociceptors but molecular and cellular mechanisms leading to the activation of nociceptors during infection are not well understood. Recent studies have shown that sensory neurons developed specific molecular mechanisms to detect pathogens, whether constitutive or

secreted molecules (Fig. 2 and Table 1). In addition to activating nociceptive signaling by cytokine release immune cells, Ochoa-Cortes et al. have shown that bacterial cell products have the potential to directly activate nociceptive signaling by altering the intrinsic excitability of nociceptive DRG neurons leading to modulate pain signaling (Ochoa-Cortes et al. 2010). In the same way as for immune pathway, pathogens are recognized by specific receptors called TLRs. TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 can recognize double-stranded RNA, LPS, flagellin, single-stranded RNA, unmethylated cytosine-guanosine (CpG), respectively. Receptors belonging to the family of transient receptor potential channel (TRP) can also recognize LPS (Alpizar et al. 2017). Several immune receptors are also expressed on nociceptors. For example, the expression of TLR4 in adult DRG neurons in mouse has been demonstrated (Acosta and Davies 2008). In addition, Gram-negative bacteria have the ability to influence sensory neurons. In fact, LPS can directly activate sensory neurons and sensitize TRPV1-mediated

capsaicin responses in trigeminal sensory neurons in vitro via TLR4 pathway (Diogenes et al. 2011; Ferraz et al. 2011). The interaction between LPS and TLR4 is well documented and might trigger intracellular signaling cascades in the nociceptors, leading to the sensitization of TRPV1. For example, *E. coli*-derived LPS activated TRPV1 channels in trigeminal neurons (Diogenes et al. 2011). Several studies have demonstrated the role of nociceptors in releasing pro-inflammatory neuropeptides to mediate neurogenic inflammatory responses (De Logu et al. 2018). Its implication in inflammatory hyperalgesia is mediated by the release of vasoactive neuropeptides such as calcitonin gene related peptide (CGRP) and substance P that have powerful effects on immune cell recruitment and activation during infection. These findings are consistent with the hypothesis that bacteria can establish direct interactions with sensory neurons. TRPV1 constitute a potential therapeutic target for chronic visceral pain, because clinical studies have demonstrated upregulation of TRPV1 expression or increase of TRPV1



**Fig. 2** Possible interaction between gut microbiota and sensory neurons via constitutive components or secreted metabolites. On one side, gut microbiota presents a large amount of constitutive elements, especially on bacterial membrane or secreted metabolites. On the other side, the expression of several specific receptors has been demonstrated and makes possible the potential direct interaction between bacteria and sensory neurons. For constitutive constituents, this is the case of TLR4 and TRPV1, receptors that can recognize LPS, or FPR1 which can recognize N-formylated peptides, TLR5 impli-

cated in the recognition of flagellin and TLR2 with PGN and LTA. Metabolites secreted by gut microbiota can also interact with others specific receptors. For example, SCFAs which can be recognized by GPR41/FFAR3. LPS lipopolysaccharide, PGN peptidoglycan, LTA lipoteichoic acids, SCFAs short-chain fatty acids, GABA gamma amino butyric acid, TLR2 toll-like receptor 2, TLR4 toll-like receptor 4, FPR1 formyl peptide receptor 1, GPR41 G-coupled receptor 41, FFAR3 free fatty acid receptor 3, DA dopamine, ACh acetylcholine

**Table 1** Several evidences that direct communication between bacteria and neurons is theoretically possible

Bacterial strain/bacterial component/metabolites	Molecular recognition/mechanisms	References
<b>Evidences of direct interaction between bacteria and neurons</b>		
Lipopolysaccharides	LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons	Diogenes et al. (2011)
	TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. Neurogenic inflammation caused by LPS is dependent on TRPA1 channel activation	Meseguer et al. (2014)
	LPS activates TRPV1, TRPM3, TRPM8 in mouse dorsal root ganglia	Boonen et al. (2018)
	Lipopolysaccharides from <i>Porphyromonas gingivalis</i> sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors	Ferraz et al. (2011)
<i>Escherichia coli</i> NLM28 lysate	<i>Escherichia coli</i> NLM28 lysate increased action potential discharge over 60% compared with control medium. Lysate activates afferent discharge from colonic mesenteric nerves. These data demonstrate that bacterial cell products can directly activate colonic DRG neurons leading to production of inflammatory cytokines by neurons and increase excitability	Ochoa-Cortes et al. (2010)
Toxins from <i>Staphylococcus aureus</i>	Nociceptor neurons showed calcium influx, action potential generation, and neuropeptide release in response to $\alpha$ -haemolysin toxin from <i>Staphylococcus aureus</i> . The toxin may directly depolarize neurons by forming pore and allowing cations to enter to cytoplasm. Toxin-induced nociceptor neurons release the immunomodulatory neuropeptide CGRP and reinforce local inflammatory response	Chiu et al. (2013)
Toxin from <i>Mycobacterium ulcerans</i>	Mycolactone elicits signaling through type 2 angiotensin II receptors and lead to potassium-dependent hyperpolarization of neurons, a direct nerve cell destruction leading to hypoesthesia	Marion et al. (2014)
<i>N</i> -formylated peptides of <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> induces calcium flux and action potentials in nociceptor neurons, in part via <i>N</i> -formylated peptides and the pore-forming toxin $\alpha$ -haemolysin	Chiu et al. (2013)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG	Studies using the formyl peptide receptor 1 and two knockout mice revealed that effects of LGG on enteric neuronal signaling were largely mediated by FPR1, expressed on enteric neuronal cells	Chandrasekharan et al. (2019)
Polysaccharide A from <i>Bacteroides fragilis</i>	Application of PSA induces action potential in IPAN enteric sensory neurons in ex vivo intestinal preparations	Mao et al. (2013)
Amuc_1100 from <i>Akkermansia muciniphila</i>	Amuc_1100 can interact with cells expressing TLR2	Plovier et al. (2017)
Serine proteases from <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Serine protease can directly impact the excitability of DRG neurons, through PAR-4 activation	Sessenwein et al. (2017)
Bacterial component/metabolites	Molecular recognition/mechanisms	References
<b>Expression of specific receptors potentially implicated in bacteria—neurons communication</b>		
SCFAs	GPR41, one of the receptor for SCFAs, is expressed in various parts of the peripheral nervous system including nodose neurons, DRG neurons and sympathetic ganglia neurons	Nøhr et al. (2015)
Flagellin	TLR5 is expressed in mouse DRG neurons	Xu et al. (2015)

**Table 1** (continued)

Bacterial component/metabolites	Molecular recognition/mechanisms	References
Peptidoglycan, lipoteichoic acid, lipopolysaccharides	TLR2, TLR3 and TLR4 induce the activation of microglia and astrocytes and the production of the proinflammatory cytokines in the spinal cord, leading to the development of inflammatory pain. TLRs are new players in the processing of pain by increasing the excitability of primary sensory neurons	Liu et al. (2012)
Others	Both human and mouse DRGs express TLR3/7/9. Murine stimulated with TLR3/7/9 ligands increase mRNA expression and protein production of many inflammatory cytokines and chemokines, previously identified as mediators of pain hypersensitivity	Qi et al. (2011)

immunoactive fibers in colonic biopsies from patients with IBD or IBS (Akbar et al. 2008). Another pathway of LPS recognition exists. In fact, LPS can also activate TRPA1 channels (Meseguer et al. 2014). TRPA1 channels are key participants in the biological response to LPS, because they do not need TLR4 to be activated and to induce neurogenic inflammation. TRPA1 is expressed in a smaller proportion (20–30%) of sensory neurons that often express neuropeptides (substance P and CGRP). Besides being expressed in extrinsic afferents, TRPA1 is expressed by enteric neurons and non-neuronal enterochromaffin cells (EC) in the gut (Lai et al. 2017). LPS modulates TRPA1 activity by inducing mechanical perturbations in plasma membrane of neuronal cells leading to release of neuropeptides, local inflammation and sustained mechanical hyperalgesia (Meseguer et al. 2014). Finally, authors hypothesized that TRPA1 channels and patterns receptors like TLR4 act as synergic sensory mechanisms, altering the host about the presence of pathogens, allergens and environmental irritants. Besides being recognized by TLR4 and TRPA1, other receptors can be activated by LPS such as transient receptor potential melastatin member 3 (TRPM3) and 8 (TRPM8) at 25 °C (but not at 35 °C), but not by TRPV2 which is insensitive to LPS. Finally, LPS can activate several receptors. Among them, TRPA1 remains the most sensitive sensory TRP channel, whereas TRPV1 requires a higher dose of LPS (Boonen et al. 2018). TLR3 and TLR7 are expressed in neurons and glial cells of the myenteric and submucous plexuses of murine small and large bowel and in plexuses of the human ileum (Barajon et al. 2009). The expression of TLR3 and TLR7 suggests that a surveillance system exists regardless of immune response. As seen in the precedent part of the review, flagellin is recognized by TLR5 and NLRC4 (Ley and Gewirtz 2016) and because TLR5 is expressed in DRG neurons, we can hypothesize that flagellated bacteria can activate sensory neurons and pain perception; this is a new way of exploring new therapeutic targets (Xu et al. 2015). *N*-formyl peptides are motifs found in bacteria and recognized by FPRs. In addition to activate immune response,

they can also induce inflammatory pain by interacting with nociceptors. It is the case of *Staphylococcus aureus* whose *N*-formyl peptide is recognized by FPR1 leading to pain perception and release of immunosuppressive neuropeptides (Chiu et al. 2013). Indeed, it has been recently demonstrated that FPR1 is expressed on the enteric neurons and the critical role of FPR1 in the regulation of enteric signaling and gut motility (Chandrasekharan et al. 2019).

The question is why do we have two systems of defense to fight against pathogen invasion? Expression of TLR3, TLR4 and TLR7 by the enteric neural network suggests that virus and bacteria could directly recognize and activate intestinal neural responses without the intervention of immune system. This direct interaction between sensory neurons and bacterial or viral agents could constitute the first piece of information about intestinal microorganisms, transmitted to the CNS (Barajon et al. 2009). If we focus at the intestinal level, it is interesting to learn that IPANs express innate immune receptors, including TLR2, TLR3, TLR4 and TLR7 that enable detection of pathogen-associated molecular patterns. It was found that the capsular polysaccharide A of *Bacteroides fragilis*, a symbiotic strain of the gut microbiota can induce activation of sensory neurons. The fact that polysaccharide A (PSA) alone can induce this response and that whole bacteria is not necessary to activate sensory neuron is an open gate to a better understanding of the mechanisms of interaction involved between symbiotic bacteria and the host and their implication in chronic pain in case of dysbiosis (Mao et al. 2013). Amuc\_1100, a protein isolated from the outer membrane of the strain *Akkermansia muciniphila*, one of the most abundant members of the human gut microbiota, can activate cells expressing TLR2 (Plovier et al. 2017). The expression of TLR in neuron cells has been demonstrated in many studies and has to draw our attention because of their potential implication for both acute nociceptive response and the maintenance of chronic pain states. In addition, multiple factors could influence the magnitude of effects leading to pain perception, including: (1) ability of bacteria to directly access the bowel sensory neurons, (2) the expression

level of TLRs which can be increased during inflammation (Fukata and Abreu 2007, 2009) such as TLR2, TLR4 and TLR5 which are upregulated in IBD (Brint et al. 2011; Cario and Podolsky 2000), (3) and the nature of the bacterial cell products that translocate into the tissues. The possible direct interaction between pathogen and neuron is not fully understood yet but recent evidences of a contact and an activation of nociceptors by *Staphylococcus aureus* allow us to extend our investigations on this field. Indeed, beneficial effects supported by several members of gut microbiota have to be described at the mechanistic level. It is clear that direct activation constitute a novel pathway of pain induction and by extension hypersensitivity often encountered in case of chronic inflammation and IBD. A better understanding of the mechanisms involved becomes a necessity to identify new therapeutic strategies in the prevention of development and in reduction of chronic pain.

#### Interaction with metabolites

Bacteria and particularly those belonging to the gut microbiota are able to produce large numbers of metabolites that can influence the immune response and pain perception via the activation or inhibition of nociceptors (Fig. 2). In fact, many of these metabolites constitute ligands of nociceptors. Among these, bacteria can produce SCFAs (Morrison and Preston 2016), toxins (Marion et al. 2014), neurotransmitters (Strandwitz 2018), capsular polysaccharides (Blandford et al. 2019) or anti-inflammatory proteins (Quévrain et al. 2016) depending on the strain. The beneficial effects of SCFAs are well documented. It has been found that FFAR3, receptor activated by short-chain fatty acids is not only expressed in enteroendocrine cells but also in postganglionic sympathetic and sensory neurons in both autonomic and somatic peripheral nervous system that potentially make a possible interaction between microbial metabolites and nervous system (Nøhr et al. 2015). These metabolites are the result of a fermentation of undigested complex carbohydrates by gut microbiota, and takes place more specifically in the colon depending on multiple factors such as composition of gut microbiota, the fiber content of the host diet and so on. SCFAs constitute an energy source for colonocytes and maintain colonic epithelium homeostasis. Specific members of gut microbiota participate in the phenomenon of cross-feeding. In fact, lactate can be metabolized to acetate, propionate or butyrate by cross-feeding organisms (Morrison et al. 2006; Ríos-Covián et al. 2016). For example, *Faecalibacterium prausnitzii* and *Roseburia* sp. metabolize acetate produced by other microorganisms (Duncan et al. 2004) and a study demonstrated that *F. prausnitzii* has the capacity to use acetate previously released by the strain *Bacteroides thetaiotaomicron* (Wrzosek et al. 2013). While metabolic pathway of acetate is widely distributed within gut microbiota,

production of propionate or butyrate is insured by several specific species. For example, *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al. 2004) is involved in production of propionate, whereas *Ruminococcus bromii* and *Faecalibacterium prausnitzii* have been identified as the major producers of butyrate (Louis et al. 2010). There is a real symbiosis between bacterial strains through a metabolic dialogue. The gut microbiota plays an important role in mucosal, neuronal and systemic 5-HT homeostasis via SCFAs production, because they can potentially affect serotonergic regulation by promoting colonic serotonin production by enterochromaffin cells (Reigstad et al. 2015). SCFAs have other several biological properties at the colon level. First, they have an impact on the luminal pH leading to an acidification that can limit the growth of pathogenic microorganisms (Macfarlane and Macfarlane, 2012). Second, they have an anti-inflammatory effect by inactivating nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and by decreasing the release of proinflammatory cytokines (Rooks and Garrett 2016) and inhibiting histone deacetylation (HDAC) (Donohoe et al. 2014). SCFAs also play an important role by maintaining epithelial integrity (via the regulation of tight junction and the expression of Zonula occludens-1 and Claudin-1) (Wang et al. 2012). Lastly, they increase mucin production (Jung et al. 2015).

Several mechanisms have been proposed to explain the beneficial effect of butyrate in visceral pain perception. First, butyrate could modulate serotonin release (which can increase the compliance of the hollow viscera leading to decrease in perception) or activate of TRPV1 receptors in the colonic mucosa by butyrate which may indirectly lead to serotonin release or induce a deactivation of TRPV1 channels by repetitive stimulations. Despite all results obtained in the colon of rats, differences observed in human were not excluded due to differences in microbial composition and in metabolism of butyrate (Kannampalli et al. 2011). Thus, we can hypothesize that these metabolites can directly act on nociceptors and have also a role in pain perception, because one of their receptor G-coupled receptor 41 (GPR41) is expressed on enteric nerves, in ganglia cells of both submucosal and myenteric ganglia (Inoue et al. 2012; Kimura et al. 2011; Nøhr et al. 2013).

Another group of metabolites that can modulate pain perception are represented by neurotransmitters. Bacteria have been found to be able to produce a wide range of neurotransmitters including catecholamines (dopamine and norepinephrine), serotonin (5-HT), noradrenaline, GABA, acetylcholine and histamine (Strandwitz 2018). The production of these compounds has been well described specifically among genus like *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. It is the case of GABA, which represents the major inhibitory neurotransmitter of the central nervous system. Production of GABA by bacteria constitutes a strategy leading to a decrease in intracellular pH (Feehily and Karatzas 2013).

Another compound can modulate pain perception, 5-HT, a signaling molecule, produced by both enterochromaffin cells and several bacteria of gut microbiota, is able to signal sensory neurons and is implicated in visceral pain. In fact, serotonin can activate transient receptor potential vanilloid member 4 (TRPV4) by three different pathways: (1) by the phosphorylation of TRPV4 by phospholipase C and protein kinase C which increase TRPV4 agonist-induced calcium signaling, (2) by the translocation of TRPV4 from the nuclear zone to the plasmic membrane, (3) by the potentiation of TRPV4 by a phospholipase A2 (Cenac et al. 2010).

In addition, the gut microbiota may be an important regulator of circulating tryptophan availability, molecular precursor of serotonin. There is a balance between tryptophan utilization and metabolism that is determined at the gastrointestinal level and tryptophan availability for the host. Amongst its many functions, serotonin is a key regulator of pain modulation through the activation of extrinsic afferent spinal and vagal nerves. Correlation between 5-HT release in gastrointestinal tract and pain in IBS patients has been shown (O'Mahony et al. 2015). The use of probiotic bacteria that can deliver neurochemicals has been also suggested as a novel treatment for neuropsychiatric diseases (Lyte 2011).

Generally speaking, there is a link between altered neurotransmission and neurological disorders and pain (Strandwitz 2018). Finally, it is easy to imagine that the interaction between gut microbiota and enteric nociceptors can occur via metabolites that they are able to produce. However, those interactions need to be better investigated at the mechanistic level to fully understand how the microbiota could modulate pain perception and to identify novel therapeutic strategies. Sessenwein et al. have demonstrated that commensal gut bacteria can directly impact the excitability of DRG neurons, through PAR-4 activation and this represents an important first step which leads to a better comprehension of the ability of gut microbiota to modulate neuronal activation (Sessenwein et al. 2017).

## Conclusion and perspectives

Painful conditions are strongly disabling because of the significant alteration of the patients' "well-being". Pain is one of the major symptoms from patients with intestinal barrier dysfunction as well as mucosal inflammation or altered motility. These patients often suffer from associated behavioral disorders such as anxiety or depression (Vivinus-Nébot et al. 2014). The role of the gut microbiota in the pathophysiology of such intestinal disorders is suggested by the presence of risk factors such as host genetics, stress, diet, antibiotic therapy, infections or occurrence of traumatic events during infancy, which can modulate the composition of the microbiota. In addition, it is now clear that certain

bacterial pathogens are capable of producing effectors that can directly activate sensory neurons that subsequently modulate the host's response to infection (including inflammatory response or defensive behaviors), demonstrating an unsuspected role for the nervous system in host–pathogen interactions. This review stressed the importance and possible etiological role of the microbiota in chronic pain and discomfort. In regard to this review, innovative therapeutic strategies targeting the microbiota could be considered, for pain management (Chassard et al. 2012; De Palma et al. 2017).

At present, many studies are being carried out to understand the interactions between microorganisms and eukaryotic cells. However, there is little interest in the direct dialogue between these microbes and neuronal cells, which are nevertheless primordial cells in host pain control. Thus, more work needs to be done on these interactions to better understand the impact and possible mechanisms linking microbiota and pain perception. For that purpose, the use of calcium imaging tools could lead to the characterization of new microbial ligands that may be responsible for an abnormal modulation of neuronal activity.

Different types of microbiome-based therapeutic approaches could be investigated in the coming few years (Valencia et al. 2017): (1) whole microbiome transplants is an intervention that introduces microbiota from a healthy donor into a patient to correct severe intestinal dysbiosis such as shown with *Clostridium difficile* infection. Beneficial effects of microbiome transplant could be investigated for other painful diseases such as chronic intestinal diseases but also extra-intestinal pathologies. (2) "Bugs as drugs" or probiotics can be used to act on the microbiome by introducing known beneficial microbes into a patient. One interesting approach is to engineer microbes that produce beneficial factors after introduction into the gut. (3) Prebiotics and probiotics can favor or block particular microbiota populations through paracrine signaling and thus modify the microbiome composition and its structure. (4) Next-generation antibiotics could be used to target drug-resistant microbial strains and provide alternatives that avoid major side effects on the microbiome. (5) Host–microbiome interaction pathways are being explored based on the analysis of metabolites produced by the microbiome, the goal being to restore the activity of the microbiome by introducing signaling molecules, typically produced through gut fermentation, that can act on known pathways—'microbiome mimics'.

Given the growing interest of gut microbiota modulation as a therapeutic target, Gilbert et al. proposed a pipeline for therapeutic strategies for neurodevelopmental disorders based on microbiome and metabolite profiling (Gilbert et al. 2013). This pipeline recommends to use disease mouse model as a first step to understand the importance of specific gut microbes and their metabolites in pathogenesis. Then,

results would be tested and validated in preclinical models by altering the microbial community and/or metabolite profile to restore the healthy state. Finally, new analogous treatments could be formulated and applied in human clinical trials.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Abernethy MG, Rosenfeld A, White JR, Mueller MG, Lewicky-Gaupp C, Kenton K (2017) Urinary microbiome and cytokine levels in women with interstitial cystitis. *Obstet Gynecol* 129:500–506
- Acosta C, Davies A (2008) Bacterial lipopolysaccharide regulates nociceptin expression in sensory neurons. *J Neurosci Res* 86:1077–1086
- Agostini S, Goubern M, Tondereau V, Salvador-Cartier C, Bezirard V, Lévêque M, Keränen H, Theodorou V, Bourdu-Naturel S, Goupil-Feuillerat N et al (2012) A marketed fermented dairy product containing *Bifidobacterium lactis* CNCM I-2494 suppresses gut hypersensitivity and colonic barrier disruption induced by acute stress in rats. *Neurogastroenterol Motil* 24:376–e172
- Aguilera M, Cerdà-Cuellar M, Martínez V (2015) Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. *Gut Microbes* 6:10–23
- Ahmadmehrabi S, Tang WHW (2017) Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases. *Curr Opin Cardiol* 32:761–766
- Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JR, Anand P, Ghosh S (2008) Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 57:923–929
- Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A, Jung C, López-Requena A, Naert R, Steelant B, Luyts K, Plata C, De Vooght V et al (2017) TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. *Nat Commun* 8:1059
- Barajon I, Serrao G, Arnaboldi F, Opizzi E, Ripamonti G, Balsari A, Rumio C (2009) Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem* 57:1013–1023
- Barbara G, Scaioli E, Barbaro MR, Biagi E, Laghi L, Cremon C, Marasco G, Colecchia A, Picone G, Salfi N et al (2017) Gut microbiota, metabolome and immune signatures in patients with uncomplicated diverticular disease. *Gut* 66:1252–1261
- Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG et al (2007) Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* 1:403–418
- Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, Barrett JS, Haines M, Doecke JD, Shepherd SJ, Muir JG, Gibson PR (2011) Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol* 106:508–514 (quiz 515)
- Blandford LE, Johnston EL, Sanderson JD, Wade WG, Lax AJ (2019) Promoter orientation of the immunomodulatory *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide A (PSA) is off in individuals with inflammatory bowel disease (IBD). *Gut Microbes* 10:1–9
- Böhn L, Störsrud S, Törnblom H, Bengtsson U, Simrén M (2013) Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life. *Am J Gastroenterol* 108:634–641
- Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, López-Requena A, Voets T, Talavera K (2018) Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. *Cell Calcium* 73:72–81
- Botschuijver S, Roeselers G, Levin E, Jonkers DM, Welting O, Heinsbroek SEM, de Weerd HH, Boekhout T, Fornai M, Masclee AA et al (2017) Intestinal fungal dysbiosis is associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology* 153:1026–1039
- Braundmeier-Fleming A, Russell NT, Yang W, Nas MY, Yaggie RE, Berry M, Bachrach L, Flury SC, Marko DS, Bushell CB et al (2016) Stool-based biomarkers of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Sci Rep* 6:26083
- Brint EK, MacSharry J, Fanning A, Shanahan F, Quigley EMM (2011) Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 106:329–336
- Cario E, Podolsky DK (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68:7010–7017
- Casén C, Vebo HC, Sekelja M, Hegge FT, Karlsson MK, Cierniejewska E, Dzankovic S, Frøyland C, Neststog R, Engstrand L et al (2015) Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther* 42:71–83
- Castiglione F, Rispo A, Di Girolamo E, Cozzolino A, Manguso F, Grassia R, Mazzacca G (2003) Antibiotic treatment of small bowel bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 18:1107–1112
- Cenac N, Altier C, Motta J-P, d'Aldebert E, Galeano S, Zamponi GW, Vergnolle N (2010) Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut* 59:481–488
- Chandrasekharan B, Saeedi BJ, Alam A, Houser M, Srinivasan S, Tansey M, Jones R, Nusrat A, Neish AS (2019) Interactions between commensal bacteria and enteric neurons, via FPR1 induction of ROS, increase gastrointestinal motility in mice. *Gastroenterology* 157:179–192
- Chassard C, Dapoigny M, Scott KP, Crouzet L, Del Homme C, Marquet P, Martin JC, Pickering G, Ardid D, Eschalier A et al (2012) Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 35:828–838
- Chehoud C, Albenberg LG, Judge C, Hoffmann C, Grunberg S, Bittinger K, Baldassano RN, Lewis JD, Bushman FD, Wu GD (2015) Fungal signature in the gut microbiota of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 21:1948–1956
- Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, Von Hehn CA, Zhao F, Tran J, Wainger B, Strominger A, Muralidharan S, Horswill AR et al (2013) Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* 501:52–57
- Choung RS, Ruff KC, Malhotra A, Herrick L, Locke GR, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Talley NJ, Saito YA (2011) Clinical predictors of small intestinal bacterial overgrowth by duodenal aspirate culture. *Aliment Pharmacol Ther* 33:1059–1067
- Cremon C, Stanghellini V, Pallotti F, Fogacci E, Bellacosa L, Morselli-Labate AM, Paccapelo A, Di Nardo G, Cogliandro RF, De Giorgio R et al (2014) Salmonella gastroenteritis during childhood is a risk factor for irritable bowel syndrome in adulthood. *Gastroenterology* 147:69–77
- Crouzet L, Gaultier E, Del Homme C, Cartier C, Delmas E, Dapoigny M, Fioramonti J, Bernalier-Donadille A (2013) The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be

- transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol Motil* 25:e272–e282
- Crowell MD (2004) Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 141:1285–1293
- Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13:701–712
- Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, Mancuso A, Mercade-Loubière M, Salvador-Cartier C, Gillet M, Ferrier L, Loubière P, Dague E et al (2014) Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:G420–G429
- Daelemans S, Peeters L, Hauser B, Vandenplas Y (2018) Recent advances in understanding and managing infantile colic. *F1000Research* 7(F1000Faculty Rev):1426
- Dai C, Guandalini S, Zhao D-H, Jiang M (2012) Antinociceptive effect of VSL#3 on visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome: a possible action through nitric oxide pathway and enhance barrier function. *Mol Cell Biochem* 362:43–53
- Darbro BW, Petroelje BK, Doern GV (2009) *Lactobacillus delbrueckii* as the cause of urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 47:275–277
- De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazanetti DI, Cristofori F, Guerzoni ME, 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 Logu F, Nassini R, Landini L, Geppetti P (2019) Pathways of CGRP Release from Primary Sensory Neurons. *Handb Exp Pharmacol* 255:65–84
- De Palma G, Lynch MDJ, Lu J, Dang VT, Deng Y, Jury J, Umeh G, Miranda PM, Pigrau Pastor M, Sidani S et al (2017) Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci Transl Med*, p 9
- de Weerth C, Fuentes S, de Vos WM (2013) Crying in infants: on the possible role of intestinal microbiota in the development of colic. *Gut Microbes* 4:416–421
- Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM (2004) *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1469–1476
- Didari T, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M (2015) Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: updated systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol* 21:3072–3084
- Diogenes A, Ferraz CCR, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM (2011) LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res* 90:759–764
- Distruitti E, Cipriani S, Mencarelli A, Renga B, Fiorucci S (2013) Probiotics VSL#3 protect against development of visceral pain in murine model of irritable bowel syndrome. *PLoS One* 8:e63893
- Donohoe DR, Holley D, Collins LB, Montgomery SA, Whitmore AC, Hillhouse A, Curry KP, Renner SW, Greenwalt A, Ryan EP et al (2014) A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner. *Cancer Discov* 4:1387–1397
- Du L-J, Chen B-R, Kim JJ, Kim S, Shen J-H, Dai N (2016) *Helicobacter pylori* eradication therapy for functional dyspepsia: systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 22:3486–3495
- Duboc H, Rainteau D, Rajca S, Humbert L, Farabos D, Maubert M, Grondin V, Jouet P, Bouhassira D, Seksik P et al (2012) Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 24(513–520):e246–e247
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2004) Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Env Microbiol* 70:5810–5817
- Dutta SK, Verma S, Jain V, Surapaneni BK, Vinayek R, Phillips L, Nair PP (2019) Parkinson's disease: the emerging role of gut dysbiosis, antibiotics, probiotics, and fecal microbiota transplantation. *J Neurogastroenterol Motil* 25:363–376
- Enck P, Mazurak N (2018) Dysbiosis in functional bowel disorders. *Ann Nutr Metab* 72:296–306
- Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer AD, Fukudo S, Mayer EA, Niesler B, Quigley EMM, Rajilić-Stojanović M, Schemann M et al (2016) Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Primer* 2:16014
- Eutamene H, Lamine F, Chabo C, Theodorou V, Rochat F, Bergonzelli GE, Corthésy-Theulaz I, Fioramonti J, Bueno L (2007) Synergy between *Lactobacillus paracasei* and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats. *J Nutr* 137:1901–1907
- Eutamène H, Garcia-Rodenas CL, Yvon S, d'Aldebert E, Foata F, Berger B, Sauser J, Theodorou V, Bergonzelli G, Mas E (2017) Luminal contents from the gut of colicky infants induce visceral hypersensitivity in mice. *Neurogastroenterol Motil, Soc.* p 29
- Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kuri-Ishikawa A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D et al (2016) Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352:560–564
- Farup PG, Rudi K, Hestad K (2016) Faecal short-chain fatty acids—a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome? *BMC Gastroenterol* 16:51
- Feehily C, Karatzas KAG (2013) Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J Appl Microbiol* 114:11–24
- Ferraz CCR, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A (2011) Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *J Endod* 37:45–48
- Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A (2014) Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 20:16079–16094
- Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D et al (2010) Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16:444–453
- Ford AC, Harris LA, Lacy BE, Quigley EMM, Moayyedi P (2018) Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 48:1044–1060
- Fox M, Knorr DA, Haptonstall KM (2019) Alzheimer's disease and symbiotic microbiota: an evolutionary medicine perspective. *Ann N Y Acad Sci* 1449:3–24
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13780–13785
- Fukata M, Abreu MT (2007) TLR4 signalling in the intestine in health and disease. *Biochem Soc Trans* 35:1473–1478
- Fukata M, Abreu MT (2009) Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Curr Opin Pharmacol* 9:680–687
- Gargari G, Taverniti V, Gardana C, Cremon C, Canducci F, Pagano I, Barbaro MR, Bellacosa L, Castellazzi AM, Valsecchi C et al (2018) Fecal Clostridiales distribution and short-chain fatty acids reflect bowel habits in irritable bowel syndrome. *Environ Microbiol* 20:3201–3213
- Gilbert JA, Krajmalnik-Brown R, Porazinska DL, Weiss SJ, Knight R (2013) Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders. *Cell* 155:1446–1448

- Halmos EP, Power VA, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG (2014) A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 146:67–75.e5
- Halpin SJ, Ford AC (2012) Prevalence of symptoms meeting criteria for irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 107:1474–1482
- Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Gavin P, Lavino A, Lustberg MB et al (2014) Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 32:1941–1967
- Hoban AE, Moloney RD, Golubeva AV, McVey Neufeld KA, O'Sullivan O, Patterson E, Stanton C, Dinan TG, Clarke G, Cryan JF (2016) Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience* 339:463–477
- Holingue C, Newill C, Lee L-C, Pasricha PJ, Daniele Fallin M (2018) Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism Res* 11:24–36
- Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF et al (2013) Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155:1451–1463
- Hsu C-C, Okumura R, Takeda K (2017) Human LYPD8 protein inhibits motility of flagellated bacteria. *Inflamm. Regen.* 37:23
- Hungin APS, Mulligan C, Pot B, Whorwell P, Agréus L, Fracasso P, Lionis C, Mendive J, de Foy J-MP, Rubin G et al (2013) Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice—an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther* 38:864–886
- Igarashi M, Nakae H, Matsuoka T, Takahashi S, Hisada T, Tomita J, Koga Y (2017) Alteration in the gastric microbiota and its restoration by probiotics in patients with functional dyspepsia. *BMJ Open Gastroenterol* 4:e000144
- Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, Brown J, Becker CA, Fleshner PR, Dubinsky M et al (2012) Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science* 336:1314–1317
- Inohara N, Chamillard M, McDonald C, Núñez G (2005) NOD-LRR PROTEINS: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74:355–383
- Inoue D, Kimura I, Wakabayashi M, Tsumoto H, Ozawa K, Hara T, Takei Y, Hirasawa A, Ishihama Y, Tsujimoto G (2012) Short-chain fatty acid receptor GPR41-mediated activation of sympathetic neurons involves synapsin 2b phosphorylation. *FEBS Lett* 586:1547–1554
- Jahng J, Jung IS, Choi EJ, Conklin JL, Park H (2012) The effects of methane and hydrogen gases produced by enteric bacteria on ileal motility and colonic transit time. *Neurogastroenterol Motil* 24(185–190):e92
- Jalanka-Tuovinen J, Salojärvi J, Salonen A, Immonen O, Garsed K, Kelly FM, Zaitoun A, Palva A, Spiller RC, de Vos WM (2014) Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut* 63:1737–1745
- Janssens Y, Wynendaele E, Verbeke F, Debonne N, Gevaert B, Aude-naert K, Van DeWiele C, De Spiegeleer B (2018) Screening of quorum sensing peptides for biological effects in neuronal cells. *Peptides* 101:150–156
- Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EMM, Simrén M (2012) An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61:997–1006
- Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B, McRorie J (2011) Effects of *Bifidobacterium infantis* 35624 on post-inflammatory visceral hypersensitivity in the rat. *Dig Dis Sci* 56:3179–3186
- Jung T-H, Park JH, Jeon W-M, Han K-S (2015) Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutr Res Pract* 9:343–349
- Kamiya T, Wang L, Forsythe P, Goettsche G, Mao Y, Wang Y, Tougas G, Bienenstock J (2006) Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut* 55:191–196
- Kang D-W, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R (2013) Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One* 8:e68322
- Kang S-S, Sim J-R, Yun C-H, Han SH (2016) Lipoteichoic acids as a major virulence factor causing inflammatory responses via Toll-like receptor 2. *Arch Pharm Res* 39:1519–1529
- Kannampalli P, Shaker R, Sengupta JN (2011) Colonic butyrate—algesic or analgesic? *Neurogastroenterol. Motil* 23:975–979
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373–384
- Kerckhoffs APM, Samsom M, van der Rest ME, de Vogel J, Knol J, Ben-Amor K, Akkermans LMA (2009) Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* 15:2887–2892
- Kim G, Deepinder F, Morales W, Hwang L, Weitsman S, Chang C, Gunsalus R, Pimentel M (2012) *Methanobrevibacter smithii* is the predominant methanogen in patients with constipation-predominant IBS and methane on breath. *Dig Dis Sci* 57:3213–3218
- Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto G (2011) Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci* 108:8030–8035
- Klem F, Wadhwa A, Prokop LJ, Sundt WJ, Farrugia G, Camilleri M, Singh S, Grover M (2017) Prevalence, Risk factors, and outcomes of irritable bowel syndrome after infectious enteritis: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 152:1042–1054.e1
- Konstantareas MM, Homatidis S (1987) Ear infections in autistic and normal children. *J Autism Dev Disord* 17:585–594
- Kowalczyk BK, Smeets HM, Succop PA, De Wit NJ, Havelaar AH (2014) Relative risk of irritable bowel syndrome following acute gastroenteritis and associated risk factors. *Epidemiol Infect* 142:1259–1268
- Krsmanovic A, Tripp DA, Nickel JC, Shoskes DA, Pontari M, Litwin MS, McNaughton-Collins MF (2014) Psychosocial mechanisms of the pain and quality of life relationship for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS). *Can Urol Assoc J* 8:403–408
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388:621–625
- Kvasnovsky CL, Leong LEX, Choo JM, Abell GCJ, Papagrigroriadis S, Bruce KD, Rogers GB (2018) Clinical and symptom scores are significantly correlated with fecal microbiota features in patients with symptomatic uncomplicated diverticular disease: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 30:107–112
- Lai M-C, Lombardo MV, Baron-Cohen S (2014) Autism. *Lancet Lond Engl* 383:896–910

- Lai NY, Mills K, Chiu IM (2017) Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial host defence. *J Intern Med* 282:5–23
- Le Nevé B, Posserud I, Böhn L, Guyonnet D, Rondeau P, Tillisch K, Naliboff B, Mayer EA, Simrén M (2013) A combined nutrient and lactulose challenge test allows symptom-based clustering of patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 108:786–795
- Lee YY, Annamalai C, Rao SSC (2017) Post-infectious irritable bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 19:56
- Ley RE, Gewirtz AT (2016) Corraling colonic flagellated microbiota. *N Engl J Med* 375:85–87
- Liu T, Gao Y-J, Ji R-R (2012) Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neurosci Bull* 28:131–144
- Long MD, Drossman DA (2010) Inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, or what? A challenge to the functional-organic dichotomy. *Am J Gastroenterol* 105:1796–1798
- Lönnfors S, Vermeire S, Greco M, Hommes D, Bell C, Avedano L (2014) IBD and health-related quality of life—discovering the true impact. *J Crohns Colitis* 8:1281–1286
- Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ (2010) Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol* 12:304–314
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230
- Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145–151
- Luczynski P, Tramuillas M, Viola M, Shanahan F, Clarke G, O'Mahony S, Dinan TG, Cryan JF (2017) Microbiota regulates visceral pain in the mouse. *ELife* 6:e25887
- Luna RA, Oezguen N, Balderas N, Venkatachalam A, Runge JK, Versalovic J, Veenstra-VanderWeele J, Anderson GM, Savidge T, Williams KC (2017) Distinct microbiome-neuroimmune signatures correlate with functional abdominal pain in children with autism spectrum disorder. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3:218–230
- Lyra A, Rinttilä T, Nikkilä J, Krogius-Kurikka L, Kajander K, Malinen E, Mättö J, Mäkelä L, Palva A (2009) Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylogeny quantification. *World J Gastroenterol* 15:5936–5945
- Lyte M (2011) Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays News Rev. Mol Cell Dev Biol* 33:574–581
- Macfarlane GT, Macfarlane S (2012) Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int* 95(1):50–60
- Magistro G (2019) Urological infections: “the time for change is now”. *Eur Urol Focus* 5:1
- Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, Mättö J, Kassinen A, Krogius L, Saarela M, Korpela R, Palva A (2005) Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol* 100:373–382
- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P et al (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55:205–211
- Mao Y-K, Kasper DL, Wang B, Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA (2013) *Bacteroides fragilis* polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons. *Nat Commun* 4:1465
- Marion E, Song O-R, Christophe T, Babonneau J, Fenistein D, Eyer J, Letournel F, Henrion D, Clere N, Paille V et al (2014) Mycobacterial toxin induces analgesia in Buruli ulcer by targeting the angiotensin pathways. *Cell* 157:1565–1576
- Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A (2009) Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* 58:751–761
- Mayer EA, Tillisch K, Gupta A (2015) Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* 125:926–938
- McCusker RH, Kelley KW (2013) Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol* 216:84–98
- McKernan DP, Fitzgerald P, Dinan TG, Cryan JF (2010) The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 22(1029–1035):e268
- Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819–826
- Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B, Fajardo O, Manenschijn J-A, Fernández-Peña C, Talavera A, Kichko T et al (2014) TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat. Commun.* 5:3125
- Miquel S, Martín R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, Eschalier A, Ardid D, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H et al (2016) Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci. Rep.* 6:19399
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EMM (2010) The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 59:325–332
- Morrison DJ, Preston T (2016) Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7:189–200
- Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT (2006) Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr* 96:570–577
- Mukhopadhyay I, Hansen R, Meharg C, Thomson JM, Russell RK, Berry SH, El-Omar EM, Hold GL (2015) The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect* 17:304–310
- Nakae H, Tsuda A, Matsuoka T, Mine T, Koga Y (2016) Gastric microbiota in the functional dyspepsia patients treated with probiotic yogurt. *BMJ Open Gastroenterol.* 3:e000109
- Nickel JC, Stephens A, Landis JR, Mullins C, van Bokhoven A, Lucia MS, Ehrlich GD, MAPP Research Network (2016) Assessment of the lower urinary tract microbiota during symptom flare in women with urologic chronic pelvic pain syndrome: A MAPP Network Study. *J. Urol.* 195:356–362
- Nickel JC, Stephens-Shields AJ, Landis JR, Mullins C, van Bokhoven A, Lucia MS, Henderson JP, Sen B, Krol JE, Ehrlich GD et al (2019) A culture-independent analysis of the microbiota of female interstitial cystitis/bladder pain syndrome participants in the MAPP research network. *J. Clin. Med.* p 8
- Niehus R, Lord C (2006) Early medical history of children with autism spectrum disorders. *J Dev Behav Pediatr JDBP* 27:S120–S127
- Nielsen HL, Engberg J, Ejlersen T, Nielsen H (2014) Psychometric scores and persistence of irritable bowel after *Campylobacter concisus* infection. *Scand J Gastroenterol* 49:545–551
- Nøhr MK, Pedersen MH, Gille A, Egerod KL, Engelstoft MS, Husted AS, Sichlau RM, Grunddal KV, Seier Poulsen S, Han S et al (2013) GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology* 154:3552–3564
- Nøhr MK, Egerod KL, Christiansen SH, Gille A, Offermanns S, Schwartz TW, Møller M (2015) Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. *Neuroscience* 290:126–137

- Nourrisson C, Scanzani J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, Viscogliosi E, Livrelli V, Delbac F, Dapoigny M et al (2014) Blastocystis is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One* 9:e111868
- O'Keefe M, Jansen C, Martin L, Williams M, Seamark L, Staudacher HM, Irving PM, Whelan K, Lomer MC (2018) Long-term impact of the low-FODMAP diet on gastrointestinal symptoms, dietary intake, patient acceptability, and healthcare utilization in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil, Soc*, p 30
- O'Mahony SM, Tramullas M, Fitzgerald P, Cryan JF (2012) Rodent models of colorectal distension. *Curr. Protoc. Neurosci.* 61:9.40 (Chapter 9)
- O'Mahony SM, Clarke G, McKernan DP, Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF (2013) Differential visceral nociceptive, behavioural and neurochemical responses to an immune challenge in the stress-sensitive Wistar Kyoto rat strain. *Behav Brain Res* 253:310–317
- O'Mahony SM, Felice VD, Nally K, Savignac HM, Claesson MJ, Scully P, Woznicki J, Hyland NP, Shanahan F, Quigley EM et al (2014) Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience* 277:885–901
- O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF (2015) Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res* 277:32–48
- Ochoa-Cortes F, Ramos-Lomas T, Miranda-Morales M, Spreadbury I, Ibeakanma C, Barajas-Lopez C, Vanner S (2010) Bacterial cell products signal to mouse colonic nociceptive dorsal root ganglia neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:G723–G732
- Okumura R, Takeda K (2018) Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflamm. Regen.* 38:5
- Okumura R, Kurakawa T, Nakano T, Kayama H, Kinoshita M, Motooka D, Gotoh K, Kimura T, Kamiyama N, Kusu T et al (2016) Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature* 532:117–121
- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, Timmis KN, Schreiber S (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53:685–693
- Ott SJ, Kühbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, Rehman A, Drews O, Weichert W, Timmis KN, Schreiber S (2008) Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* 43:831–841
- Parkes GC, Rayment NB, Hudspith BN, Petrovska L, Lomer MC, Brostoff J, Whelan K, Sanderson JD (2012) Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 24:31–39
- Pärty A, Luoto R, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E (2013) Effects of early prebiotic and probiotic supplementation on development of gut microbiota and fussing and crying in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Pediatr.* 163:1272–1277.e1–2
- Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Faouder PL, Galano J-M, Guy A, Knauf C, Tabet JC, Tronnet S, Barreau F et al (2017) Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat. Commun.* 8:1314
- Piche T, Ducrotté P, Sabate JM, Coffin B, Zerbib F, Dapoigny M, Hua M, Marine-Barjoan E, Dainese R, Hébuterne X (2010) Impact of functional bowel symptoms on quality of life and fatigue in quiescent Crohn disease and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 22:626–e174
- Pimentel M, Lin HC, Enayati P, van den Burg B, Lee H-R, Chen JH, Park S, Kong Y, Conklin J (2006) Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G1089–G1095
- Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Chiu IM (2017) Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. *Trends Immunol* 38:5–19
- Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L et al (2017) A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 23:107–113
- Ponnusamy K, Choi JN, Kim J, Lee S-Y, Lee CH (2011) Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *J Med Microbiol* 60:817–827
- Porter CK, Cash BD, Pimentel M, Akinseye A, Riddle MS (2012) Risk of inflammatory bowel disease following a diagnosis of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* 12:55
- Posserud I, Strid H, Störsrud S, Törnblom H, Svensson U, Tack J, Van Oudenhove L, Simrén M (2013) Symptom pattern following a meal challenge test in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *United Eur. Gastroenterol. J.* 1:358–367
- Pourmand H, Esmailzadeh A (2017) Consumption of a low fermentable oligo-, di-, mono-saccharides, and polyols diet and irritable bowel syndrome: a systematic review. *Int. J. Prev. Med.* 8:104
- Pozuelo M, Panda S, Santiago A, Mendez S, Accarino A, Santos J, Guarner F, Azpiroz F, Manichanh C (2015) Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with irritable bowel syndrome. *Sci. Rep.* 5:12693
- Qi J, Buzas K, Fan H, Cohen JJ, Wang K, Mont E, Klinman D, Oppenheim JJ, Howard OMZ (2011) Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. *J. Immunol. Baltim. Md 1950(186):*6417–6426
- Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermúdez-Humarán LG, Pigneur B et al (2016) Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65:415–425
- Rajilić-Stojanović M, de Vos WM (2014) The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 38:996–1047
- Reigstad CS, Salmons CE, Rainey JF, Szurszewski JH, Linden DR, Sonnenburg JL, Farrugia G, Kashyap PC (2015) Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J* 29:1395–1403
- Ren K, Dubner R (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 16:1267–1276
- Rigsbee L, Agans R, Shankar V, Kenche H, Khamis HJ, Michail S, Paliy O (2012) Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 107:1740–1751
- Ringel Y, Ringel-Kulka T (2015) The intestinal microbiota and irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 49(Suppl 1):S56–S59
- Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N (2016) Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol* 7:185
- Rodiño-Janeiro BK, Vicario M, Alonso-Cotoner C, Pascua-García R, Santos J (2018) A review of microbiota and irritable bowel syndrome: future in therapies. *Adv. Ther.* 35:289–310
- Rondanelli M, Riva A, Morazzoni P, Allegrini P, Faliva MA, Naso M, Miccono A, Peroni G, Degli Agosti I, Perna S (2017) The effect and safety of highly standardized Ginger (*Zingiber officinale*) and Echinacea (*Echinacea angustifolia*) extract supplementation

- on inflammation and chronic pain in NSAIDs poor responders. A pilot study in subjects with knee arthrosis. *Nat Prod Res* 31:1309–1313
- Rooks MG, Garrett WS (2016) Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 16:341–352
- Rooks MG, Veiga P, Wardwell-Scott LH, Tickle T, Segata N, Michaud M, Gallini CA, Beal C, van Hylckama-Vlieg JET, Ballal SA et al (2014) Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *ISME J* 8:1403–1417
- Rossi O, Khan MT, Schwarzer M, Hudcovic T, Srutkova D, Duncan SH, Stolte EH, Kozakova H, Flint HJ, Samsom JN et al (2015) *Faecalibacterium prausnitzii* strain HTF-F and its extracellular polymeric matrix attenuate clinical parameters in DSS-induced colitis. *PLoS One* 10:e0123013
- Rostami A, Riahi SM, Haghighi A, Saber V, Armon B, Seyyedtabaei SJ (2017) The role of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res* 116:2361–2371
- Rueda-Ruzafa L, Cruz F, Roman P, Cardona D (2019) Gut microbiota and neurological effects of glyphosate. *Neurotoxicology* 75:1–8
- Saulnier DM, Riehle K, Mistretta T-A, Diaz M-A, Mandal D, Raza S, Weidler EM, Qin X, Coarfa C, Milosavljevic A et al (2011) Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 141:1782–1791
- Savino F, Cresi F, Pautasso S, Palumeri E, Tullio V, Roana J, Silvestro L, Oggero R (2004) Intestinal microflora in breastfed colicky and non-colicky infants. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992(93):825–829
- Schumann D, Langhorst J, Dobos G, Cramer H (2018) Randomised clinical trial: yoga vs a low-FODMAP diet in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 47:203–211
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90:859–904
- Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 14:e1002533
- Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M (2014) Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Pain* 155:2461–2470
- Sessenwein JL, Baker CC, Pradhananga S, Maitland ME, Petrof EO, Allen-Vercoe E, Noordhof C, Reed DE, Vanner SJ, Lomax AE (2017) Protease-mediated suppression of DRG neuron excitability by commensal bacteria. *J Neurosci* 37:11758–11768
- Shen S, Lim G, You Z, Ding W, Huang P, Ran C, Doheny J, Caravan P, Tate S, Hu K et al (2017) Gut microbiota is critical for the induction of chemotherapy-induced pain. *Nat Neurosci* 20:1213–1216
- Shepherd SJ, Parker FC, Muir JG, Gibson PR (2008) Dietary triggers of abdominal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: randomized placebo-controlled evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6:765–771
- Shoskes DA, Macoska JA (2017) Preface to the human microbiome in urologic health and disease. *Ann Transl Med* 5:27
- Shoskes DA, Altemus J, Polackwich AS, Tucky B, Wang H, Eng C (2016) The urinary microbiome differs significantly between patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and controls as well as between patients with different clinical phenotypes. *Urology* 92:26–32
- Siddiqui H, Lagesen K, Nederbragt AJ, Jeansson SL, Jakobsen KS (2012) Alterations of microbiota in urine from women with interstitial cystitis. *BMC Microbiol* 12:205
- Simrén M, Tack J (2018) New treatments and therapeutic targets for IBS and other functional bowel disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15:589–605
- Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Doré J (2006) Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:106–111
- Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H-P, Jegou S, Landman C, Cohen D, Liguori G, Bourrier A, Nion-Larmurier I et al (2017) Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 66:1039–1048
- Spiller RC, Humes DJ, Campbell E, Hastings M, Neal KR, Dukes GE, Whorwell PJ (2010) The Patient Health Questionnaire 12 Somatic Symptom scale as a predictor of symptom severity and consulting behaviour in patients with irritable bowel syndrome and symptomatic diverticular disease. *Aliment Pharmacol Ther* 32:811–820
- Staudacher HM, Lomer MCE, Farquharson FM, Louis P, Fava F, Franciosi E, Scholz M, Tuohy KM, Lindsay JO, Irving PM et al (2017) A diet low in FODMAPs reduces symptoms in patients with irritable bowel syndrome and a probiotic restores bifidobacterium species: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 153:936–947
- Stojanovska V, McQuade RM, Fraser S, Prakash M, Gondalia S, Stavely R, Palombo E, Apostolopoulos V, Sakkal S, Nurgali K (2018) Oxaliplatin-induced changes in microbiota, TLR4+ cells and enhanced HMGB1 expression in the murine colon. *PLoS One* 13:e0198359
- Stollman N, Raskin JB (2004) Diverticular disease of the colon. *Lancet Lond. Engl.* 363:631–639
- Strandwitz P (2018) Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res* 1693:128–133
- Strober W, Fuss I, Mannon P (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 117:514–521
- Su T, Liu R, Lee A, Long Y, Du L, Lai S, Chen X, Wang L, Si J, Owyang C et al (2018) Altered intestinal microbiota with increased abundance of prevotella is associated with high risk of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2018:6961783
- Sudo N (2012) Role of microbiome in regulating the HPA axis and its relevance to allergy. *Chem Immunol Allergy* 98:163–175
- Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, Kubo C, Koga Y (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558:263–275
- Suzuki H, Moayyedi P (2013) *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10:168–174
- Szajewska H, Dryl R (2016) Probiotics for the management of infantile colic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 63(Suppl 1):S22–S24
- Takagi A, Yanagi H, Ozawa H, Uemura N, Nakajima S, Inoue K, Kawai T, Ohtsu T, Koga Y (2016) Effects of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 on *Helicobacter pylori*-associated dyspepsia: a multicenter randomized double-blind controlled trial. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016:7490452
- Talley NJ (2017) Functional dyspepsia: advances in diagnosis and therapy. *Gut Liver* 11:349–357
- Talley NJ, Ford AC (2016) Functional dyspepsia. *N Engl J Med* 374:896
- Tan KSW (2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 21:639–665
- Tan VPY, Liu KSH, Lam FYF, Hung IFN, Yuen MF, Leung WK (2017) Randomised clinical trial: rifaximin versus placebo for the treatment of functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 45:767–776
- Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S (2010) Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 22(512–519):e114–e115
- Tap J, Derrien M, Törnblom H, Brazeilles R, Cools-Portier S, Doré J, Störsrud S, Le Nevé B, Öhman L, Simrén M (2017) Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 152:111–123.e8

- Treem WR, Ahsan N, Kastoff G, Hyams JS (1996) Fecal short-chain fatty acids in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: in vitro studies of carbohydrate fermentation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 23:280–286
- Uhde M, Ajamian M, Caio G, De Giorgio R, Indart A, Green PH, Verna EC, Volta U, Alaedini A (2016) Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut* 65:1930–1937
- Valencia PM, Richard M, Brock J, Boglioli E (2017) The human microbiome: opportunity or hype? *Nat. Rev. Drug Discov.* 16:823–824
- Van de Wiele T, Van Praet JT, Marzorati M, Drennan MB, Elewaut D (2016) How the microbiota shapes rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 12:398–411
- Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J (2016) Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* 65:57–62
- Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, Huang X-X, Blennerhassett P, Jackson W, Mao Y, Wang L, Rochat F, Collins SM (2006) Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 55:182–190
- Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, Enot DP, Pfirschke C, Engblom C, Pittet MJ et al (2013) The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342:971–976
- Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, Dainese R, Bernard G, Anty R, Filippi J, Saint-Paul MC, Tulic MK, Verhasselt V et al (2014) Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 63:744–752
- Wallace KL, Zheng L-B, Kanazawa Y, Shih DQ (2014) Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20:6–21
- Wang H-B, Wang P-Y, Wang X, Wan Y-L, Liu Y-C (2012) Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci* 57:3126–3135
- Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA (2013) Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 4:42
- Wensaas K-A, Langeland N, Hanevik K, Mørch K, Eide GE, Rortveit G (2012) Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: historic cohort study. *Gut* 61:214–219
- Whelan K, Martin LD, Staudacher HM, Lomer MCE (2018) The low FODMAP diet in the management of irritable bowel syndrome: an evidence-based review of FODMAP restriction, reintroduction and personalisation in clinical practice. *J. Hum Nutr Diet* 31:239–255
- White RJ (2009) Wound infection-associated pain. *J. Wound Care* 18:245–249
- Wolf AJ, Underhill DM (2018) Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 18:243–254
- Wrzosek L, Miquel S, Noordine M-L, Bouet S, Chevalier-Curt MJ, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C et al (2013) *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* 11:61
- Xu Z-Z, Kim YH, Bang S, Zhang Y, Berta T, Wang F, Oh SB, Ji R-R (2015) Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nat Med* 21:1326–1331
- Xu D, Chen VL, Steiner CA, Berinstein JA, Eswaran S, Waljee AK, Higgins PDR, Owyang C (2019) Efficacy of fecal microbiota transplantation in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol* 114:1043–1050
- Yılmaz İ, Dolar ME, Özpınar H (2019) Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: a randomized controlled trial. *Turk J Gastroenterol* 30:242–253
- Yoon H, Lee DH, Lee Y-H, Jeong J-C, Lee ST, Choi M-G, Jeon SW, Shim K-N, Baik GH, Kim JG et al (2018) Efficacy and safety of U105MSP015CT in functional dyspepsia: a randomized, controlled trial. *Gut Liver* 12:516–522
- Youn YH, Kim HC, Lim HC, Park JJ, Kim J-H, Park H (2016) Long-term clinical course of post-infectious irritable bowel syndrome after shigellosis: a 10-year follow-up study. *J Neurogastroenterol Motil* 22:490–496
- Zahedi MJ, Behrouz V, Azimi M (2018) Low fermentable oligo-di-mono-saccharides and polyols diet versus general dietary advice in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial. *J Gastroenterol Hepatol* 33:1192–1199
- Zanini B, Ricci C, Bandera F, Caselani F, Magni A, Laronga AM, Lanzini A, San Felice del Benaco Study Investigators (2012) Incidence of post-infectious irritable bowel syndrome and functional intestinal disorders following a water-borne viral gastroenteritis outbreak. *Am. J. Gastroenterol.* 107:891–899
- Zhan Y, Zhan Y-A, Dai S-X (2018) Is a low FODMAP diet beneficial for patients with inflammatory bowel disease? A meta-analysis and systematic review. *Clin Nutr Edinb Scotl* 37:123–129
- Zhuang X, Xiong L, Li L, Li M, Chen M (2017) Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 32:28–38
- Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashardes S, Kotler E, Zur M, Regev-Lehavi D, Brik RB-Z et al (2018) Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell* 174:1388–1405.e21

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

## ANNEXE 4

Douleur analg. (2021) 34:86-96  
DOI 10.3166/dea-2021-0144

ARTICLE ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

### Influence du microbiote sur la douleur\*

#### Impact of the Microbiota on Pain

S. Gervason · M. Defaye · D. Ardid · J.-Y. Berthon · C. Altier · E. Filaire · F.A. Carvalho

© Lavoisier SAS 2021

**Résumé** De plus en plus d'études indiquent que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle important sur les fonctions du système nerveux en modulant l'activité des cellules nerveuses. Il a été montré que les produits dérivés des bactéries peuvent influencer la perception de la douleur. De plus, des perturbations du microbiote (ou dysbiose) sont souvent associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales comme des désordres neurodégénératifs ou des troubles développementaux. Cette revue présente les études précliniques et cliniques mettant en évidence un impact du microbiote sur la perception de la douleur dans différents contextes pathologiques. Le lien entre le microbiote et l'activation des neurones est discuté au travers de l'interaction directe hôte-microbiote qui implique l'activation des nocicepteurs par les composés ou métabolites microbiens. De nouvelles études sur l'interaction entre le microbiote et le système nerveux devraient conduire à l'identification de nouveaux ligands microbiens et de médicaments ciblant les

récepteurs de l'hôte, qui pourraient à terme améliorer la gestion de la douleur chronique et le « bien-être ».

**Mots clés** microbiote · axe cerveau/intestin · douleurs viscérales

**Abstract** An increasing number of studies indicates the central role played by the intestinal microbiota on the peripheral and central nervous system. Indeed, it has been shown that not only bacterial-derived products can influence the perception of pain, but also perturbations in microbiota (or dysbiosis) are often associated with intestinal or extra-intestinal pathologies such as neurodegenerative or developmental disorders. In this review, we present the preclinical and clinical studies highlighting the impact of the microbiota on the perception of pain in different pathological contexts. We discuss the cellular and molecular mechanisms by which intestinal microbiota modulate “pain-sensing” sensory neurons at the periphery, and the overall impact of the brain/gut/microbiota axis in the control of aversive painful behaviors and neurological disorders. Finally, we discuss the direct host/microbiota interaction which involves the activation of nociceptors by microbe-associated molecular patterns (MAMPs). Thus, new studies on the interaction between the microbiota and the nervous system should lead to the identification of microbial ligands and drugs targeting host receptors, which could ultimately improve the management of chronic pain and “well-being”.

**Keywords** microbiota · brain/gut axis · visceral pain

#### Introduction

Les douleurs chroniques affectent des millions de personnes à travers le monde. Ces douleurs récurrentes, difficiles à traiter, sont très souvent associées à des perturbations de la qualité de vie des patients. Alors que la douleur aiguë constitue un mécanisme de défense de l'hôte, les douleurs chroniques se définissent par une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou

S. Gervason · J.-Y. Berthon · E. Filaire  
GREENTECH SA, Saint-Beauzire, F-63360 France

S. Gervason · D. Ardid · F.A. Carvalho (✉)  
Inserm U1107, NeuroDol, CRHN d'Auvergne,  
université de Clermont-Auvergne,  
28, place Henri-Dunant, BP 38,  
F-63001 Clermont-Ferrand, France  
e-mail : frederic.carvalho@inserm.fr

M. Defaye · C. Altier  
Department of Physiology and Pharmacology,  
Inflammation Research Network,  
Snyder Institute for Chronic Diseases,  
Cumming School of Medicine,  
University of Calgary, AB T2N 4N1, Canada

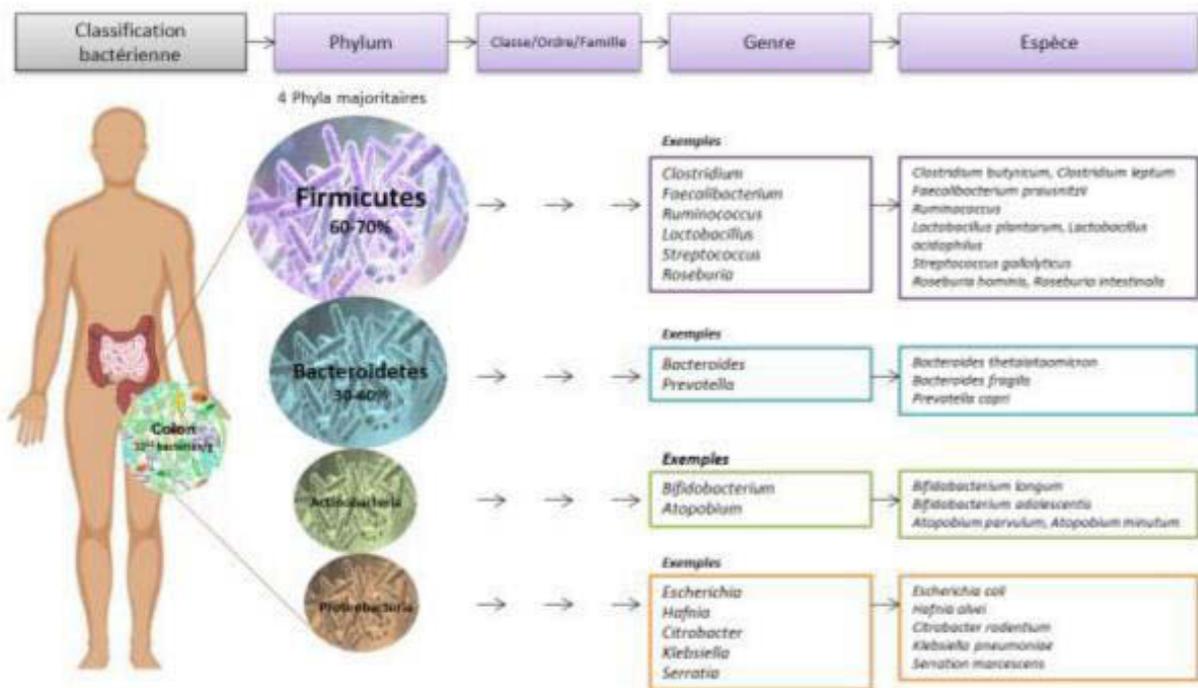
E. Filaire  
INRA, unité de nutrition humaine ECREIN,  
CRNH d'Auvergne, université de Clermont-Auvergne,  
F-63000 Clermont-Ferrand, France

\* Gervason Sandie et Defaye Manon ont contribué de manière équivalente à ce travail.

potentielle, ou décrite en termes évoquant une telle lésion, évoluant depuis plus de trois à six mois et/ou susceptible d'affecter de façon péjorative le comportement ou le « bien-être » du patient, attribuable à toute cause non maligne.

Au sein du corps humain, il existe une population dynamique et florissante appelée microbiote. Composé de bactéries, d'archées, de virus, de parasites et de champignons, il forme un superorganisme symbiotique. La plus forte densité de micro-organismes réside au sein du tractus gastro-intestinal. Chez l'Homme, ce microbiote intestinal comprend environ  $10^{14}$  micro-organismes avec une prédominance de bactéries. Les micro-organismes sont classés selon leur rang taxonomique. Cette classification est composée de sept rangs principaux : règne, phylum, classe, ordre, famille, genre et enfin l'espèce (Fig. 1). Au cours de la dernière décennie, les avancées considérables des technologies de séquençage à haut débit et l'utilisation d'animaux exempts

de micro-organismes (animaux axéniques ou *germ free*) ont contribué à l'amélioration des connaissances sur la composition, la diversité et les fonctions du microbiote intestinal. Le côlon abrite la population la plus abondante de micro-organismes du tractus intestinal, avec environ  $10^{11}$  bactéries par gramme de contenu intestinal, constituée à 80 % d'espèces anaérobies strictes appartenant à trois phyla principaux, les Bacteroidetes (30–40 %), les Firmicutes (60–70 %) et les Actinobacteria (Fig. 1). Il existe néanmoins d'importantes variations interindividuelles, qualitatives et quantitatives. Si ces variations interindividuelles sont en partie liées à la génétique de l'hôte et à des facteurs environnementaux, ces mêmes facteurs peuvent aussi moduler la composition du microbiote et être à l'origine d'un déséquilibre de ce dernier. Ces altérations du microbiote intestinal, nommées dysbioses, sont constatées dans de nombreuses pathologies, qu'elles soient intestinales telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII) ou les maladies inflammatoires chroniques de



**Fig. 1 Classification et composition générale du microbiote intestinal.** Notre microbiote intestinal est composé de nombreux micro-organismes : levures, champignons, virus et bactéries. Le microbiote bactérien est à ce jour le mieux connu et représente 90 % du microbiote intestinal total. Les bactéries appartiennent à différents sous-ensembles de groupes bactériens (phyla). Les bactéries intestinales, et plus particulièrement celles retrouvées au niveau du côlon, appartiennent à quatre phyla majoritaires : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria. Bien que les Actinobacteria et Proteobacteria soient minoritaires, ils sont pourtant essentiels. Les phyla regroupent plusieurs familles bactériennes dans lesquelles sont retrouvés différents genres bactériens puis des espèces. Par exemple, au sein du phylum des Firmicutes, il est possible de trouver les bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*, regroupant plusieurs espèces comme *Lactobacillus plantarum*

l'intestin (MICI) ou extra-intestinales (fibromyalgie [FM], neuropathies périphériques causées par la chimiothérapie [NPC]).

Depuis quelques années, un intérêt particulier pour le microbiote et le développement des douleurs chroniques associées à ces pathologies a conduit à l'émergence de nouvelles thérapeutiques visant la composition et la fonction du microbiote intestinal. Dans cette revue, nous présentons les études précliniques et cliniques mettant en évidence l'impact du microbiote sur les voies de signalisation de la douleur dans différents contextes pathologiques. Par la suite, les mécanismes impliquant les neurones sensoriels et les différents métabolites microbiens, pouvant contribuer à ces douleurs chroniques, seront discutés.

## Pathologies, douleurs associées et microbiote

### Douleur viscérale

Depuis quelques années, de nombreux modèles animaux ont été utilisés afin de comprendre l'implication du microbiote intestinal dans les douleurs viscérales. Les souris axéniques présentent une hypersensibilité viscérale associée à une augmentation de l'expression des *toll-like receptors* (TLR) 1-9 et à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines 6 et 10 (IL-6 et IL-10) et de *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  au niveau de la moelle épinière. Ces modifications sont corrigées après recolonisation du tractus par un microbiote intestinal conventionnel montrant l'importance du microbiote commensal dans l'excitabilité neuronale [1]. De même, l'utilisation d'antibiotiques de manière précoce induit, à l'âge adulte, une hypersensibilité viscérale associée à des altérations des canaux ioniques tels que le *transient receptor potential vanilloid member 1* (TRPV1), l'*alpha-2A adrenergic receptor* et le *cholecystokinin B receptor* dans la moelle épinière. Un effet analgésique des antibiotiques a également été décrit dans différents modèles d'hypersensibilité viscérale ou encore chez le rat naïf [2], alors que d'autres études montrent un effet proalgique suite à l'utilisation d'antibiotiques [3].

### Syndrome de l'intestin irritable

Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle touchant environ 11 % de la population mondiale et altérant significativement la qualité de vie des patients. Prédominante chez la femme, cette pathologie se caractérise par des douleurs abdominales chroniques associées à des troubles du transit en l'absence de modifications macroscopiques de la paroi intestinale. Le SII est une pathologie multifactorielle dont la pathogenèse reste complexe et pour laquelle aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour. Depuis quelques

années, la place du microbiote dans la physiopathologie du SII est largement décrite.

#### • Altération de la communauté bactérienne

La modulation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes est un indicateur de la perturbation de la composition du microbiote intestinal. Dans la littérature, les études rapportent à la fois une augmentation ou une diminution de ce ratio chez les patients souffrant de SII. Ces divergences pourraient s'expliquer par la méthodologie utilisée ou encore le sous-type de SII diagnostiqué. De manière générale, les études montrent une augmentation de l'abondance relative de bactéries pro-inflammatoires incluant la famille des Enterobacteriaceae et une réduction de l'abondance relative des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, et la réduction de l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii* [4]. L'ensemble de ces bactéries joue un rôle important dans la dégradation des composés non digestibles ingérés conduisant à la production des acides gras à chaîne courte (AGCC) impliqués dans le maintien de l'homéostasie intestinale. La modulation des AGCC incluant l'acétate, le butyrate et le propionate est décrite chez les patients atteints de SII. Le modèle de séparation maternelle mimant la physiopathologie du SII a montré que la modulation du microbiote par différentes souches de probiotiques du genre *Bifidobacterium (lactis)*, *Lactobacillus (paracasei)* ou encore *F. prausnitzii* normalise l'hypersensibilité viscérale associée [5]. Récemment, une augmentation de l'abondance relative du genre *Lactobacillus* et plus globalement de la classe des Lactobacillales a été montrée chez les patients atteints de SII pouvant expliquer les concentrations élevées d'acide acétique associées à la sévérité des douleurs abdominales [6]. L'augmentation de l'abondance relative de bactéries sulfatoréductrices productrices d' $H_2S$  est aussi retrouvée chez les patients atteints de SII [7]. Il a été montré chez des rats axéniques que le transfert de microbiote fécal de patients atteints de SII présentant une augmentation de ces bactéries sulfatoréductrices induit de l'hypersensibilité viscérale. Le méthane a été lui aussi associé au développement du SII. L'augmentation des taux de méthane chez les patients atteints de SII se caractérise par la présence de Methanobacterales (appartenant au règne des Archées) associées à l'augmentation de l'abondance relative de l'ordre des Clostridiales se traduisant par un ralentissement du transit [8].

En se fondant sur ces observations, certains traitements du SII visent à moduler la composition du microbiote intestinal. Une surproduction de gaz peut être induite par la consommation de glucides fermentescibles à chaîne courte appelés FODMAPs (*fermentable oligo-, di-, monosaccharides and polyols*), qui sont des aliments riches en oligosaccharides, en disaccharides et en polyols. De nombreuses études cliniques ont rapporté une réduction importante des

symptômes des patients atteints de SII avec une alimentation appauvrie en FODMAPs [9]. Des probiotiques peuvent aussi être utilisés et sont composés principalement de bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* [10]. Enfin, deux études cliniques randomisées ont été publiées dans le cadre d'un transfert de microbiote fécal, mais les résultats sont contradictoires [11,12].

- Altération de la communauté eucaryote

#### *Fungi*

Le règne des Fungi est un composant très minoritaire (0,1 %) du microbiote intestinal, appelé mycobiote. Malgré cette faible abondance, une récente étude a évalué le profil fongique chez les patients atteints de SII [13]. Dans cette étude, le pourcentage des espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, qui est de 57 % chez les patients témoins, s'élève à 76 % chez les patients atteints de SII. Parallèlement, les expérimentations réalisées chez l'animal ont révélé que l'hypersensibilité viscérale induite lors d'un stress néonatal par séparation maternelle pouvait être réduite par l'utilisation d'antifongiques [13].

#### *Protozoaires*

Certains protozoaires ont été spécifiquement retrouvés chez les patients atteints de SII et peuvent être à l'origine du développement des douleurs dans le cadre du SII postinfectieux (SII-PI). Certaines de ces douleurs persistent après l'élimination du parasite tel que *Giardia duodenalis*. *Blastocystis* est le protozoaire intestinal le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme, mais son rôle en santé humaine est encore débattu. Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté une plus forte prévalence de *Blastocystis spp.* chez les patients souffrant de SII en comparaison avec des individus témoins [14]. La présence d'une dysbiose intestinale a également été étudiée chez les patients atteints de SII porteurs ou non de *Blastocystis* [14]. Récemment, une étude chez le rat montre que l'infection par *Blastocystis* était capable d'induire de l'hypersensibilité colique associée à une dysbiose intestinale [15].

### **Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Les MICI regroupent principalement la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Toutes deux se caractérisent par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. Ces maladies évoluent par phases de poussées inflammatoires, de durée et de fréquence extrêmement variables selon les patients, interrompues par des phases de rémission. En cas d'atteinte iléale, la douleur abdominale et la diarrhée sont les symptômes prédominants pendant la phase active de la pathologie. Cependant, plus de 40 % des patients souffrent de douleurs abdominales durant les phases de rémission en l'absence d'inflammation. De nombreuses études rapportent des différences dans la composition du microbiote intestinal chez les patients atteints de MICI.

Cependant, ces études portent principalement sur la composition du microbiote intestinal durant la phase active de la pathologie en lien avec l'inflammation, et très peu sont associées au développement des douleurs. Parmi les Firmicutes, les clusters *Clostridium XIVa* et *IV*, dont l'espèce *F. prausnitzii*, sont significativement diminués dans les biopsies iléales et les échantillons fécaux issus de patients atteints de MC [16]. Les concentrations d'AGCC chez les patients atteints de MICI sont également diminuées et corrèlent avec la sévérité de la pathologie [17]. Toutefois, une étude préclinique a montré que l'hypersensibilité viscérale post-inflammatoire était associée à une augmentation des concentrations en AGCC [3]. L'abondance relative de nombreuses bactéries commensales dites « pathogènes » est également augmentée chez les patients atteints de MICI telles que les *Escherichia coli* nommées AIEC (pour *Adherent-invasive E. coli*). Ces dernières bactéries sont présentes chez au moins 40 % des malades souffrant de MC. L'utilisation de souris humanisées exprimant le récepteur CEACAM6 a permis de caractériser le rôle de la souche AIEC de référence LF82 dans la douleur post-inflammatoire [18].

L'utilisation d'antibiotiques montre une amélioration de la douleur chez les patients atteints de MICI [19]. Cependant, l'utilisation de modèles animaux a mis en évidence un rôle délétère des antibiotiques dans le développement de l'hypersensibilité viscérale [3]. Rares sont les études montrant la réduction de la douleur associée au MICI par les probiotiques ou prébiotiques. Une récente méta-analyse a montré qu'un régime faible en FODMAPs améliore la douleur viscérale présente chez les patients en phase de rémission [20].

### **Dyspepsie fonctionnelle**

La dyspepsie fonctionnelle (DF) se définit par la présence de douleurs ou d'inconfort dans la partie haute de l'abdomen. Le diagnostic repose sur la présence de ces symptômes dyspeptiques récurrents et en l'absence de marqueurs inflammatoires. La physiopathologie de la DF est complexe et mal connue. Initialement, l'analyse du microbiote dans les fluides gastriques de patients atteints de DF a révélé une augmentation du ratio Bactéroïdètes/Proteobactéria associée à une absence du phylum Actinobacteria et à une augmentation de l'abondance du genre *Prevotella* [21]. De nombreux groupes se sont intéressés au microbiote associé à la muqueuse, mais il existe une forte disparité dans les résultats. Une augmentation de l'abondance du phylum des Firmicutes et notamment du genre *Streptococcus* a été montrée en corrélation avec la sévérité des symptômes [22]. Au niveau des traitements ciblant le microbiote, la rifaximine a montré un effet bénéfique sur la douleur chez les patients atteints de DP [23]. Des probiotiques tels que *Lactobacillus gasseri* présentent aussi une certaine efficacité [24].

### **Colique infantile**

Les coliques infantiles (CI) se caractérisent par des épisodes de pleurs ou de cris difficiles à calmer, voire inconsolables, chez le nourrisson en bonne santé de quatre mois et moins. Ces pleurs doivent durer plus de trois heures par jour, plus de trois fois par semaine et depuis plus de trois semaines (« règle des 3 » de Wessel). La CI est un syndrome multifactoriel avec un nombre croissant d'études suggérant que le microbiote intestinal contribue à son développement. Les nourrissons atteints de CI montrent un profil microbien différent de celui de nourrissons témoins en termes de diversité et de composition [25]. La réduction de la diversité et la présence de certains micro-organismes ont été associées positivement à l'augmentation de la fréquence des pleurs chez les nourrissons, notamment les bactéries appartenant au phylum des Proteobacteria [25]. Au sein de ce phylum, une augmentation de l'abondance des *Escherichia* et des *Klebsiella* est retrouvée dans les selles de nourrissons atteints de coliques. Les Proteobacteria impliquées dans la fermentation du lactose et des carbohydrates peuvent conduire à l'accumulation des gaz chez le nourrisson entraînant des douleurs abdominales [26]. La réduction de l'abondance relative des bifidobactéries et des Lactobacilles a été associée à l'intensité des pleurs [25]. Une méta-analyse a montré que *Lactobacillus reuteri* serait un probiotique de choix dans le traitement de la CI [27].

### **Troubles du spectre de l'autisme**

Les troubles du spectre de l'autisme (TSA), résultant d'anomalies neurodéveloppementales, apparaissent précocement au cours de la petite enfance et persistent à l'âge adulte. Ils se manifestent par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer. En plus des aspects cognitifs, les personnes atteintes de TSA peuvent présenter des manifestations gastro-intestinales telles que des douleurs abdominales. L'étiologie de ces douleurs est peu connue. Des altérations de l'axe cerveau/intestin/microbiote ont été montrées dans le cadre des TSA. Il existe de nombreuses évidences quant à l'établissement d'une dysbiose intestinale chez les enfants atteints de TSA. Les concentrations d'AGCC, notamment de propionate, sont fortement augmentées chez les patients atteints de TSA. Cette production est associée positivement à l'augmentation de l'abondance de l'espèce *Bacteroides vulgatus* ou encore du genre *Desulfovibrio* [28]. Récemment, une étude a mis en évidence le rôle des Clostridiales dans le développement d'une hypersensibilité viscérale chez les patients atteints de TSA versus des patients TSA normosensibles [29]. Cette augmentation de l'abondance d'espèces appartenant aux Clostridiales a d'ailleurs été corrélée à l'élévation des concentrations de sérotonine et de tryptophane dans les

biopsies de patients. Les modèles animaux de TSA montrent également une augmentation de la synthèse de sérotonine (5-HT), ce qui entraîne l'apparition de symptômes gastro-intestinaux associés [30]. Au niveau des traitements symptomatiques du TSA, certains probiotiques sont prescrits pour lutter contre les symptômes gastro-intestinaux tels que *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium infantis*. Des résultats prometteurs, publiés par Kang et al., révèlent que le transfert de microbiote fécal réduit les symptômes gastro-intestinaux [31].

### **Douleur extra-intestinale**

#### **Fibromyalgie**

La FM se caractérise par des douleurs musculosquelettiques généralisées, souvent associées à une grande fatigue, des troubles du sommeil et d'autres altérations cognitives. L'examen clinique ne met en évidence aucune anomalie que ce soit articulaire, musculaire ou neurologique. De récentes études montrent que le microbiote intestinal contribue au développement de cette pathologie. Bien que ces études soient peu nombreuses, elles ont décrit une réduction de l'abondance de bactéries productrices d'AGCC telles que *F. prausnitzii* ou *Bacteroides uniformis* [32]. À l'inverse, de nombreuses bactéries issues des genres *Bacteroides* et *Clostridium*, impliquées dans le métabolisme des acides biliaires, voient leur abondance relative augmentée chez ces patients [33]. Un régime alimentaire végétarien riche en Lactobacilles a montré une réduction des symptômes, alors que l'utilisation de probiotique n'a révélé aucun effet sur les scores douloureux des patients avec FM [34].

#### **Neuropathies périphériques causées par la chimiothérapie**

Ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans le traitement du cancer. Néanmoins, l'utilisation de la chimiothérapie (oxaliplatine, paclitaxel) entraîne des douleurs chroniques associées à une altération de la qualité de vie et qui se prolongent dans le temps malgré la fin du traitement. Ces patients présentent alors des NPC. Bien que le microbiote intestinal soit rarement étudié chez les patients atteints de NPC, quelques études chez l'animal ont décrit la contribution du microbiote dans le développement de ces douleurs. La chimiothérapie est capable de moduler la composition du microbiote chez l'animal [35]. Réciproquement, Shen et al. ont montré que l'hyperalgésie mécanique induite par l'oxaliplatine était réduite chez des souris axéniques ou bien des souris prétraitées avec des antibiotiques [36]. La recolonisation des souris axéniques au préalable restaure l'hyperalgésie mécanique. Récemment, le transfert de microbiote fécal de souris hyperalgiques (mécanique et thermique)

chez des souris axéniques révèle l'importance du microbiote intestinal dans le développement de ce phénotype douloureux [37].

### Modulation de la douleur par les micro-organismes

La douleur est un système d'alarme protégeant l'organisme et déclenchant des réponses réflexes comportementales, dont le but est d'en supprimer la cause et d'en limiter les conséquences. La perception de la douleur fait intervenir des neurones spécialisés appelés nocicepteurs. Ces cellules spécialisées sont situées dans la peau, les muqueuses, les os, les articulations, les muscles et les viscères, et sont impliquées dans la douleur. En effet, en réponse à des stimuli potentiellement dommageables pour l'hôte, ces neurones sensoriels peuvent conduire à des douleurs ou à des modifications comportementales. L'activation de ces nocicepteurs par divers stimuli (mécanique, chimique ou thermique) entraîne la génération d'un potentiel d'action qui est alors transmis par les fibres nerveuses jusqu'à la corne postérieure au niveau de la moelle épinière. Cette information douloureuse remonte jusqu'au tronc cérébral où elle sera codée par le thalamus en message douloureux. L'une des particularités de la douleur viscérale est qu'elle est médiée par les voies vagale et spinale. Ces deux voies de signalisation sont impliquées dans différents processus physiologiques. La voie spinale est associée à la perception douloureuse, tandis que la voie vagale est liée au fonctionnement homéostatique et physiologique des organes. Néanmoins, un dysfonctionnement du nerf vague au niveau digestif peut participer aux douleurs viscérales. Il est probable que les métabolites microbiens constituent de véritables messagers modulateurs de la douleur viscérale, en passant par ces deux innervations au niveau du côlon, modulant alors l'axe cerveau/intestin/microbiote, ce qui suscite un intérêt grandissant depuis ces dernières années [38].

Il est largement admis que les micro-organismes pathogènes peuvent interagir avec les neurones sensoriels par des mécanismes impliquant la réponse immunitaire. Les cellules de l'immunité représentant la première ligne de défense contre les agents infectieux, la détection de pathogènes et l'initiation d'une réponse de défense rapide constituent le principal processus de défense de l'hôte. Le modèle de séparation maternelle chez la souris, qui consiste à séparer temporairement les nouveau-nés de leur mère, génère un stress permettant aujourd'hui d'étudier l'impact du lien établi entre la mère et le nouveau-né sur des aspects physiologiques. Dans ce modèle, l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de protéases contribuerait ainsi au développement d'une hyperalgésie viscérale en lien avec une augmentation de la perméabilité intestinale [39].

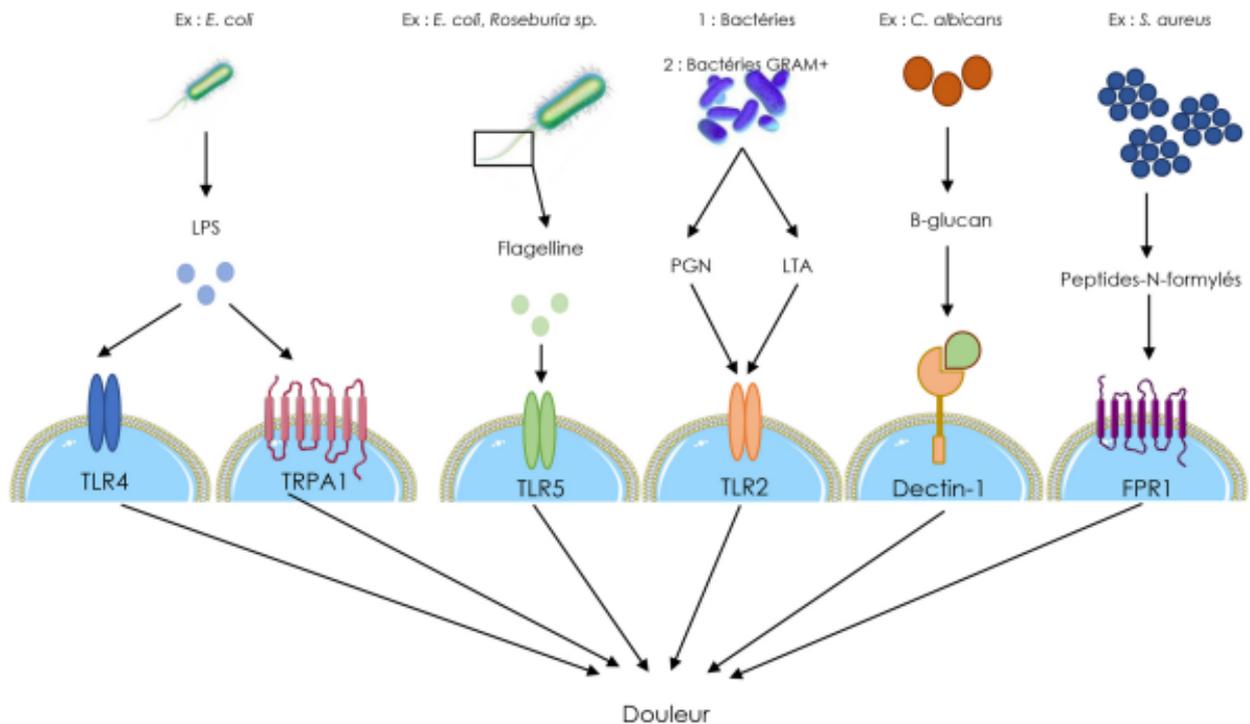
La coexpression de nombreux récepteurs entre les systèmes immunitaires et nerveux témoigne d'un langage commun et permet d'imaginer un grand nombre d'interactions possibles entre le microbiote et le système nerveux. Alors que l'initiation de la douleur via la reconnaissance de motifs bactériens par le système immunitaire est largement documentée, peu de mécanismes moléculaires impliqués dans une interaction directe bactérie-neurone sont décrits. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est indispensable pour identifier de nouvelles cibles pharmacologiques et proposer des solutions thérapeutiques efficaces et adaptées.

### Motifs bactériens

De récentes études ont montré que les nocicepteurs sont capables de détecter différents micro-organismes, via divers éléments, qu'ils soient constitutifs (Fig. 2) ou bien sécrétés (Fig. 3). Les bactéries à Gram négatif possèdent des motifs bactériens membranaires hautement réactifs, les lipopolysaccharides (LPS), pouvant moduler l'activité des neurones en interagissant avec le TLR4 exprimé à leur surface. Cette interaction entre le LPS et le TLR4 conduit à une sensibilisation du canal TRPV1 impliqué dans la perception douloureuse [40]. En plus d'activer TLR4, le LPS peut également activer le canal *transient receptor potential ankyrin subtype 1* (TRPA1) [41]. La flagelline, composant des flagelles bactériens, est reconnue par les récepteurs TLR5 et *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing 4* (NLRC4) du système immunitaire. Le récepteur TLR5 est également exprimé par les neurones des ganglions de la racine dorsale, ce qui suggère que la reconnaissance de ce motif peut induire une réponse douloureuse. D'autres TLRs sont aussi exprimés par les nocicepteurs. C'est le cas de TLR3 et TLR7 exprimés par les cellules neuronales, mais il n'y a aucune évidence quant à leur rôle dans la transmission du message douloureux. Enfin, le peptidoglycane (PGN), constituant majoritaire de la paroi bactérienne, est un motif impliqué dans la régulation de l'inflammation intestinale et pourrait représenter une voie de communication directe avec le système nerveux, puisque le récepteur TLR2 est exprimé par les neurones sensitifs [42].

Les peptides N-formylés sont des composés bactériens thermostables reconnus par les récepteurs formyl peptide (FPRs). Ils sont capables d'induire une réponse immunitaire mais également un message douloureux en interagissant avec les nocicepteurs à proximité. C'est notamment le cas de *Staphylococcus aureus* dont les peptides N-formylés, reconnus par FPR1, conduisent à une sensation douloureuse chez la souris [43].

*C. albicans*, principale souche incriminée dans le développement de la mycose vaginale, joue également un rôle dans l'initiation de la douleur. Une exposition répétée conduirait au développement d'une hypersensibilité. *C. albicans* présente



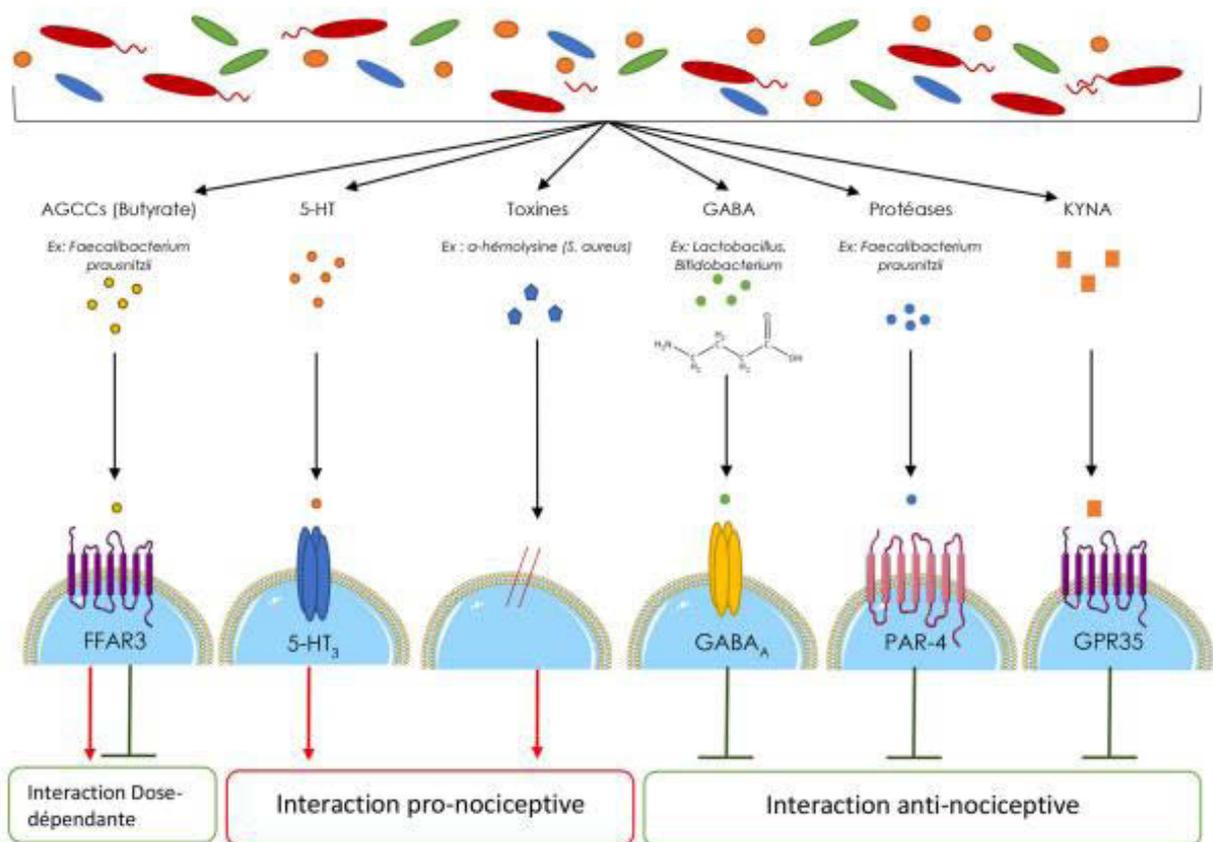
**Fig. 2 Mécanismes d'interactions possibles entre des composés constitutifs microbiens et le système nerveux à l'origine du déclenchement de la douleur.** Le microbiote contient un grand nombre d'éléments constitutifs, souvent associés à leur membrane, à leur paroi ou à leur flagelle reconnus par des récepteurs coexprimés par les cellules de l'immunité et par les cellules du système nerveux. Cette reconnaissance peut conduire au déclenchement d'une inflammation, mais aussi parfois à un signal douloureux. LPS : lipopolysaccharides ; PGN : peptidoglycane ; LTA : acide lipotéichoïque ; TLR : toll-like receptor ; TRPA1 : transient receptor potential cation channel A, 1 ; FPR1 : formyl peptide receptor 1

dans sa paroi des  $\beta$ -glucanes et des mannanes, composés reconnus par les cellules de l'immunité via le récepteur TLR4. Cette activation conduit à la libération de cytokines pro-inflammatoires contribuant à l'allodynie observée chez les patientes atteintes de mycoses vaginales. Plus récemment, une équipe a découvert que *C. albicans*, de manière directe, induisait de la douleur via le récepteur dectin-1 exprimé par les nocicepteurs [44].

### Métabolites bactériens

Les micro-organismes, et en particulier la communauté bactérienne, sont capables de produire et de sécréter un grand nombre de métabolites pouvant interagir avec les nocicepteurs (Fig. 3). Parmi eux, les AGCC, les toxines, les neurotransmetteurs, les polysaccharides ou encore des protéines anti-inflammatoires peuvent être cités selon la souche bactérienne. Par exemple, les toxines produites par les micro-organismes peuvent initier une sensation douloureuse. C'est le cas de la toxine hémolytique ( $\alpha$ -HL) sécrétée par *S. aureus* qui, de façon directe, est capable d'activer les neurones [43].

Les AGCC sont produits au niveau de la lumière intestinale à partir de fibres alimentaires non digestibles par l'hôte et grâce à des enzymes bactériennes du microbiote intestinal. Ces composés interviennent dans un réseau complexe d'alimentation croisée entre différents représentants du microbiote intestinal. Le lactate est métabolisé en acétate, propionate ou butyrate par différents micro-organismes. Il arrive aussi que les produits intermédiaires tels que l'acétate ou le propionate soient métabolisés en butyrate. Par exemple, *F. prausnitzii* et *Roseburia spp.* transforment l'acétate préalablement libéré par d'autres bactéries comme *Bacteroides thetaiotaomicron*. Contrairement aux autres AGCC, le propionate et le butyrate ne sont produits que par quelques représentants du microbiote. C'est le cas d'*Akkermansia muciniphila*, forte productrice de propionate [45]. À l'inverse, les souches *F. prausnitzii* et *R. bromi* produisent de grandes quantités de butyrate [46]. Dans ce contexte, *F. prausnitzii* a déjà prouvé son effet analgésique dans des modèles d'études précliniques du SII [5]. Afin d'expliquer les bénéfices du butyrate produit par ces souches dans la douleur, plusieurs mécanismes d'action ont été proposés.



**Fig. 3 Mécanismes d'interaction entre le microbiote et le système nerveux via des métabolites sécrétés.** Le microbiote intestinal est capable de produire un grand nombre de métabolites. Certains de ces composés sont reconnus spécifiquement par des récepteurs neuro-naux. Cette reconnaissance est responsable du déclenchement de réponses pronociceptives ou antinociceptives, parfois dose-dépendantes, selon le métabolite. AGCC : acides gras à chaînes courtes ; 5-HT : sérotonine ; GABA : *gamma amino butyric acid* ; KYNA : acide kynurénique

Ainsi, le butyrate interviendrait dans la modulation de la production de sérotonine (5-HT). Une libération répétée de 5-HT en association avec une activation prolongée du canal TRPV1 entraîne un phénomène de désensibilisation conduisant à la réduction de la douleur [47]. Le récepteur FFAR3 reconnaît le butyrate et est exprimé à la surface des neurones sympathiques et sensoriels dans le système nerveux périphérique autonome et somatique. Cela suggère que les AGCC, en plus d'agir via le système endocrinien, peuvent jouer un rôle sur le système nerveux. Il n'y a cependant aucune indication que FFAR3 soit directement impliqué dans le processus nociceptif au niveau viscéral [48]. Néanmoins, il n'est pas impossible que le microbiote intestinal, via la production des AGCC, soit capable de moduler la perception douloureuse. À ce titre, les effets analgésiques des AGCC ont été démontrés chez des volontaires sains et chez des patients atteints de SII, et cela, indépendamment du mode d'adminis-

tration. Chez les sujets sains, l'instillation de butyrate dans la partie distale du côlon permet de réduire la douleur et l'inconfort liés à la distension colorectale [49]. Banasiewicz et al. ont montré que l'administration orale de butyrate permettait de réduire la fréquence des douleurs abdominales chez les patients atteints de SII [50]. À l'inverse, des effets pronociceptifs du butyrate ont été reportés [51]. Bien qu'une dose élevée de butyrate induise un effet pronociceptif, une dose physiologique, à l'inverse, conduit à un effet analgésique dans un modèle de SII chez le rat [52].

La 5-HT, produite majoritairement par les cellules entérochromaffines, peut également être produite par certaines souches bactériennes. La 5-HT peut induire des douleurs viscérales via l'activation du canal TRPV4 exprimé sur les afférences primaires [53]. Par ailleurs, le microbiote est un acteur clé dans la production de 5-HT, puisqu'il intervient dans le métabolisme du tryptophane, le précurseur de la

5-HT, en modifiant la teneur en tryptophane disponible. Il existe une balance entre le tryptophane produit et le tryptophane métabolisé. Une corrélation a été établie entre les concentrations de 5-HT libérée au niveau intestinal et la douleur observée chez les patients atteints de SII [54]. L'acide kynurénique (KYNA), composé issu du métabolisme du tryptophane, est une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la douleur inflammatoire, puisqu'il posséderait des propriétés neuromodulatrices et immunomodulatrices [55]. En activant le *G protein-coupled receptor 35* (GPR35), le KYNA exercerait une activité analgésique [55]. Il semblerait que le microbiote intestinal soit aussi impliqué dans la modulation de la production de KYNA et par conséquent impliqué une nouvelle fois dans les activités neuromodulatrices. Le microbiote intestinal (notamment les Lactobacilles et les bifidobactéries) produit également d'autres neuromédiateurs tels que la dopamine, la noradrénaline, le GABA, l'acétylcholine ou encore l'histamine. Dans une visée thérapeutique, la souche *E. coli* Nissle 1917 a été décrite comme capable de synthétiser un lipopeptide C12AsnGABAOH capable de passer la barrière épithéliale et d'activer les récepteurs GABA<sub>B</sub> [56].

Les données sur les métabolites bactériens et le système nerveux périphérique s'enrichissent de jour en jour et ont permis de mieux comprendre ce dialogue complexe au sein de l'axe cerveau/intestin/microbiote. Toutes ces interactions constituent l'évidence même du rôle majeur et central du microbiote intestinal dans les processus physiologiques humains. De nouvelles études sur l'interaction entre le microbiote et le système nerveux devraient conduire à l'identification de nouveaux ligands microbiens ayant une activité neuromodulatrice. Par la suite, en se fondant sur ces observations, il serait possible de produire de nouvelles molécules (ou médicaments) ciblant les récepteurs de l'hôte, qui pourraient à terme améliorer la gestion de la douleur chronique et le « bien-être » chez l'Homme.

**Remerciements** Manon Defaye a reçu des subventions de la Région Auvergne-Rhône-Alpes via un cofinancement de la Région Auvergne-Rhône-Alpes et du FEDER en 2015 (« Thématiques émergentes »). De plus, ce travail a été soutenu par le ministère de la Recherche et de la Technologie, l'Inserm, l'université de Clermont-Auvergne et I-Site Cap20-25

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

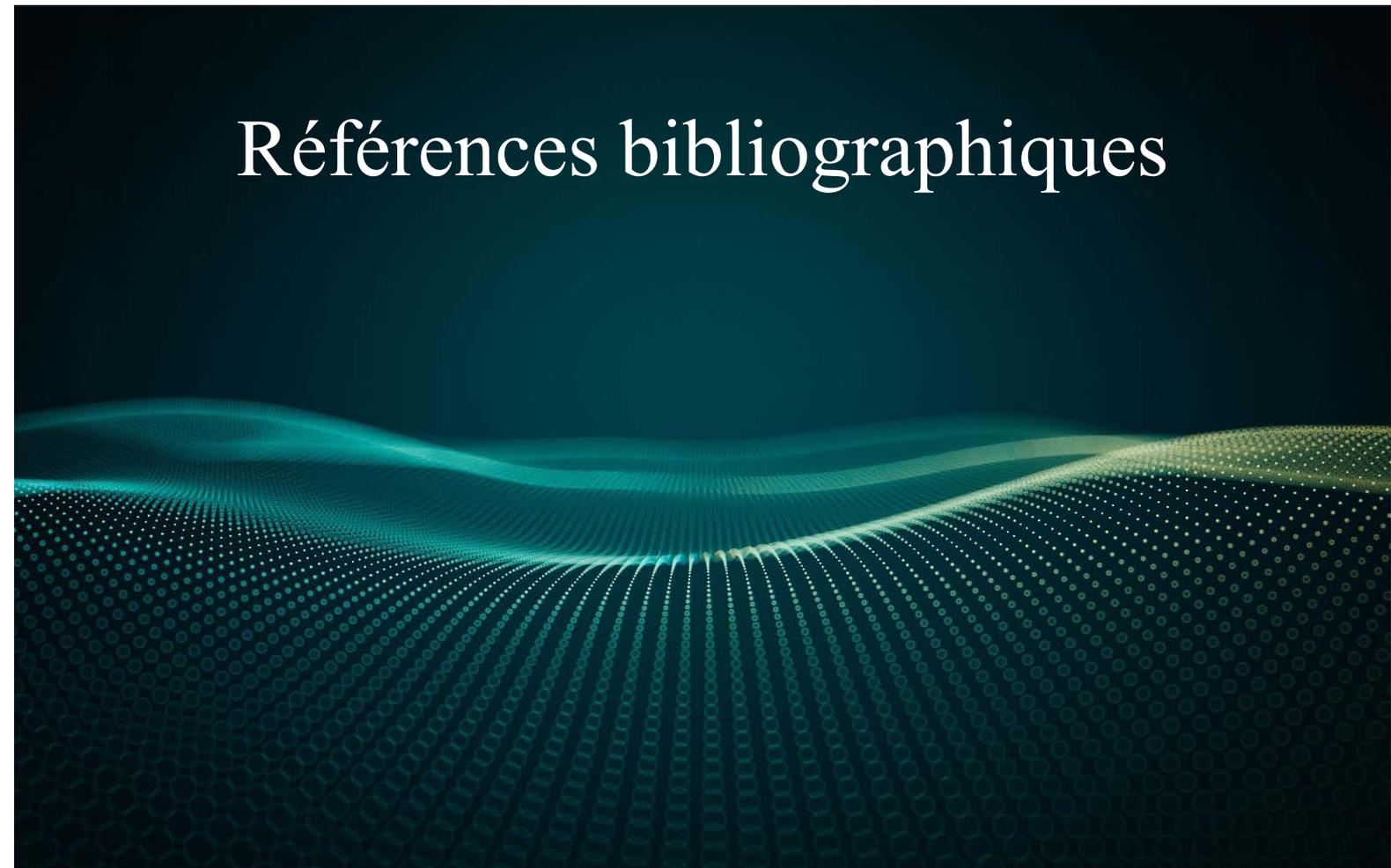
## Références

- Luczynski P, Tramullas M, Viola M, et al (2017) Microbiota regulates visceral pain in the mouse. *eLife* 6. doi:10.7554/eLife.25887
- Hoban AE, Moloney RD, Golubeva AV, et al (2016) Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience* 339:463–77. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.003
- Esquerre N, Basso L, Defaye M, et al (2020) Colitis-induced microbial perturbation promotes postinflammatory visceral hypersensitivity. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 10:225–44. doi:10.1016/j.jcmgh.2020.04.003
- Zhuang X, Xiong L, Li L, et al (2017) Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 32:28–38. doi:10.1111/jgh.13471
- Miquel S, Martín R, Lashermes A, et al (2016) Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep* 6:19399. doi:10.1038/srep19399
- Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, et al (2010) Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 22:512–9. e114–115. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x
- Crouzet L, Gaultier E, Del'Homme C, et al (2013) The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol Motil* 25:e272–e282. doi:10.1111/nmo.12103
- Tap J, Derrien M, Tömbölm H, et al (2017) Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 152:111–23.e8. doi:10.1053/j.gastro.2016.09.049
- Staudacher HM, Whelan K (2017) The low FODMAP diet: recent advances in understanding its mechanisms and efficacy in IBS. *Gut* 66:1517–27. doi:10.1136/gutjnl-2017-313750
- Enck P, Mazurak N (2018) Dysbiosis in functional bowel disorders. *Ann Nutr Metab* 72:296–306. doi:10.1159/000488773
- Halkjær SI, Christensen AH, Lo BZS, et al (2018) Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: results from a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Gut* 67:2107–15. doi:10.1136/gutjnl-2018-316434
- Johansen PH, Hilpüsch F, Cavanagh JP, et al (2018) Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 3:17–24. doi:10.1016/S2468-1253(17)30338-2
- Botschuijver S, Roeselers G, Levin E, et al (2017) Intestinal fungal dysbiosis is associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology* 153:1026–39. doi:10.1053/j.gastro.2017.06.004
- Nourrisson C, Scanzì J, Pereira B, et al (2014) Blastocystis is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One* 9:e111868. doi:10.1371/journal.pone.0111868
- Defaye M, Nourrisson C, Baudu E, et al (2020) Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically blastocystis-infected rats. *Sci Rep* 10:9146. doi:10.1038/s41598-020-66156-w
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16731–6. doi:10.1073/pnas.0804812105
- Zhuang X, Li T, Li M, et al (2019) Systematic review and meta-analysis: short-chain fatty acid characterization in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 25:1751–63. doi:10.1093/ibd/izz188

18. Lashermes A, Boudieu L, Barbier J, et al (2018) Adherent-invasive *E. coli* enhances colonic hypersensitivity and P2X receptors expression during post-infectious period. *Gut Microbes* 9:26–37. doi:10.1080/19490976.2017.1361091
19. Castiglione F, Rispo A, Di Girolamo E, et al (2003) Antibiotic treatment of small bowel bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 18:1107–12
20. Zhan Y, Zhan YA, Dai SX (2018) Is a low FODMAP diet beneficial for patients with inflammatory bowel disease? A meta-analysis and systematic review. *Clin Nutr Edinb Scotl* 37:123–9. doi:10.1016/j.clnu.2017.05.019
21. Igarashi M, Nakae H, Matsuoka T, et al (2017) Alteration in the gastric microbiota and its restoration by probiotics in patients with functional dyspepsia. *BMJ Open Gastroenterol* 4:e000144. doi:10.1136/bmjgast-2017-000144
22. Fukui A, Takagi T, Naito Y, et al (2020) Higher levels of streptococcus in upper gastrointestinal mucosa associated with symptoms in patients with functional dyspepsia. *Digestion* 101:38–45. doi:10.1159/000504090
23. Tan VPY, Liu KSH, Lam FYF, et al (2017) Randomized clinical trial: rifaximin versus placebo for the treatment of functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 45:767–76. doi:10.1111/apt.13945
24. Ohtsu T, Takagi A, Uemura N, et al (2017) The ameliorating effect of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 on functional dyspepsia in *Helicobacter pylori*-uninfected individuals: a randomized controlled study. *Digestion* 96:92–102. doi:10.1159/000479000
25. de Weerth C, Fuentes S, de Vos WM (2013) Crying in infants: on the possible role of intestinal microbiota in the development of colic. *Gut Microbes* 4:416–21. doi:10.4161/gmic.26041
26. Rhoads JM, Fatheree NY, Norori J, et al (2009) Altered fecal microflora and increased fecal calprotectin in infants with colic. *J Pediatr* 155:823–8.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2009.05.012
27. Dryl R, Szajewska H (2018) Probiotics for management of infantile colic: a systematic review of randomized controlled trials. *Arch Med Sci AMS* 14:1137–43. doi:10.5114/aoms.2017.66055
28. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, et al (2010) Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16:444–53. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.06.008
29. Luna RA, Oezguen N, Balderas M, et al (2017) Distinct microbiome-neuroimmune signatures correlate with functional abdominal pain in children with autism spectrum disorder. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3:218–30. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.11.008
30. Golubeva AV, Joyce SA, Moloney G, et al (2017) Microbiota-related changes in bile acid & tryptophan metabolism are associated with gastrointestinal dysfunction in a mouse model of autism. *EBioMedicine* 24:166–78. doi:10.1016/j.ebiom.2017.09.020
31. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, et al (2017) Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 5:10. doi:10.1186/s40168-016-0225-7
32. Erdrich S, Hawrelak JA, Myers SP, et al (2020) Determining the association between fibromyalgia, the gut microbiome and its biomarkers: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord* 21:181. doi:10.1186/s12891-020-03201-9
33. Studer N, Desharnais L, Beutler M, et al (2016) Functional intestinal bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylation by *Clostridium scindens* associated with protection from *Clostridium difficile* infection in a gnotobiotic mouse model. *Front Cell Infect Microbiol* 6:191. doi:10.3389/fcimb.2016.00191
34. Roman P, Estévez AF, Miras A, et al (2018) A pilot randomized controlled trial to explore cognitive and emotional effects of probiotics in fibromyalgia. *Sci Rep* 8:10965. doi:10.1038/s41598-018-29388-5
35. Zhong S, Zhou Z, Liang Y, et al (2019) Targeting strategies for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: does gut microbiota play a role? *Crit Rev Microbiol* 45:369–93. doi:10.1080/1040841X.2019.1608905
36. Shen S, Lim G, You Z, et al (2017) Gut microbiota is critical for the induction of chemotherapy-induced pain. *Nat Neurosci* 20:1213–6. doi:10.1038/nn.4606
37. Ramakrishna C, Corleto J, Ruegger PM, et al (2019) Dominant role of the gut microbiota in chemotherapy induced neuropathic pain. *Sci Rep* 9:20324. doi:10.1038/s41598-019-56832-x
38. Defaye M, Gervason S, Altier C, et al (2020) Microbiota: a novel regulator of pain. *J Neural Transm Vienna* 127:445–65. doi:10.1007/s00702-019-02083-z
39. Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, et al (2007) New insights in the etiology and pathophysiology of irritable bowel syndrome: contribution of neonatal stress models. *Pediatr Res* 62:240–5. doi:10.1203/PDR.0b013e3180db2949
40. Wu Y, Wang Y, Wang J, et al (2019) TLR4 mediates upregulation and sensitization of TRPV1 in primary afferent neurons in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis. *Mol Pain* 15:1744806919830018. doi:10.1177/1744806919830018
41. Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, et al (2014) TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat Commun* 5:3125. doi:10.1038/ncomms4125
42. Laman JD, 't Hart BA, Power C, et al (2020) Bacterial peptidoglycan as a driver of chronic brain inflammation. *Trends Mol Med* 26:670–82. doi:10.1016/j.molmed.2019.11.006
43. Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, et al (2013) Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* 501:52–7. doi:10.1038/nature12479
44. Maruyama K, Takayama Y, Sugisawa E, et al (2018) The ATP transporter VNUT mediates induction of dectin-1-triggered Candida nociception. *iScience* 6:306–18. doi:10.1016/j.isci.2018.08.007
45. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al (2004) *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1469–76. doi:10.1099/ijs.0.02873-0
46. Louis P, Young P, Holtrop G, et al (2010) Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA: acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol* 12:304–14. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x
47. Kannampalli P, Shaker R, Sengupta JN (2011) Colonic butyrate-algesic or analgesic? *Neurogastroenterol Motil* 23:975–9. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01775.x
48. Nøhr MK, Egerod KL, Christiansen SH, et al (2015) Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. *Neuroscience* 290:126–37. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.040
49. Vanhoutvin SALW, Troost FJ, Kilkens TOC, et al (2009) The effects of butyrate enemas on visceral perception in healthy volunteers. *Neurogastroenterol Motil* 21:952-e76. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01324.x
50. Banasiewicz T, Krokowicz L, Stojcev Z, et al (2013) Microencapsulated sodium butyrate reduces the frequency of abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome. *Colorectal Dis* 15:204–9. doi:10.1111/j.1463-1318.2012.03152.x
51. Bourdu S, Dapigny M, Chapuy E, et al (2005) Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of non-inflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* 128:1996–2008. doi:10.1053/j.gastro.2005.03.082
52. Nozu T, Miyagishi S, Nozu R, et al (2019) Butyrate inhibits visceral allodynia and colonic hyperpermeability in rat models of irritable bowel syndrome. *Sci Rep* 9:19603. doi:10.1038/s41598-019-56132-4

53. Cenac N, Altier C, Motta JP, et al (2010) Potentiation of TRPV4 signaling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut* 59:481–8. doi:10.1136/gut.2009.192567
54. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, et al (2015) Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res* 277:32–48. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.027
55. Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, et al (2011) G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology* 60:1227–31. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.11.014
56. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martín P, et al (2017) Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun* 8:1314. doi:10.1038/s41467-017-01403-9

# Références bibliographiques





**Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J.** The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6: 237ra65, 2014.

**Acosta C, Davies A.** Bacterial lipopolysaccharide regulates nociceptin expression in sensory neurons. *J Neurosci Res* 86: 1077–1086, 2008.

**Adam B, Liebrechts T, Gschossmann JM, Krippner C, Scholl F, Ruwe M, Holtmann G.** Severity of mucosal inflammation as a predictor for alterations of visceral sensory function in a rat model. *Pain* 123: 179–186, 2006.

**Adams JB, Borody TJ, Kang D-W, Khoruts A, Krajmalnik-Brown R, Sadowsky MJ.** Microbiota transplant therapy and autism: lessons for the clinic. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 13: 1033–1037, 2019.

**Aguilera-Lizarraga J, Florens MV, Viola MF, Jain P, Decraecker L, Appeltans I, Cuende-Estevez M, Fabre N, Van Beek K, Perna E, Balemans D, Stakenborg N, Theofanous S, Bosmans G, Mondelaers SU, Matteoli G, Ibiza Martínez S, Lopez-Lopez C, Jaramillo-Polanco J, Talavera K, Alpizar YA, Feyerabend TB, Rodewald H-R, Farre R, Redegeld FA, Si J, Raes J, Breynaert C, Schrijvers R, Bosteels C, Lambrecht BN, Boyd SD, Hoh RA, Cabooter D, Nelis M, Augustijns P, Hendrix S, Strid J, Bisschops R, Reed DE, Vanner SJ, Denadai-Souza A, Wouters MM, Boeckxstaens GE.** Local immune response to food antigens drives meal-induced abdominal pain. *Nature* 590: 151–156, 2021.

**Agus A, Planchais J, Sokol H.** Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host & Microbe* 23: 716–724, 2018.

**Ahl A, Mikocka-Walus A, Gordon A, Andrews JM.** Are self-administered or minimal therapist contact psychotherapies an effective treatment for irritable bowel syndrome (IBS): A systematic review. *Journal of Psychosomatic Research* 75: 113–120, 2013.

**Ait-Belgnaoui A, Colom A, Braniste V, Ramalho L, Marrot A, Cartier C, Houdeau E, Theodorou V, Tompkins T.** Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol Motil* 26: 510–520, 2014.

**Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Brydon WG, Walters JRF, Anand P, Ghosh S.** Expression of the TRPV1 receptor differs in quiescent inflammatory bowel disease with or without abdominal pain. *Gut* 59: 767–774, 2010.

**Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JRF, Anand P, Ghosh S.** Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 57: 923–929, 2008.

**Alard J, Lehrter V, Rhimi M, Mangin I, Peucelle V, Abraham A-L, Mariadassou M, Maguin E, Waligora-Dupriet A-J, Pot B, Wolowczuk I, Grangette C.** Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ Microbiol* 18: 1484–1497, 2016.

**Alexander JL, Wilson ID, Teare J, Marchesi JR, Nicholson JK, Kinross JM.** Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 356–365, 2017.

**Almeida M.** Caractérisation de flores microbiennes intestinale humaine et fromagère par méthode de métagénomique quantitative. 162, 2013.

**Alonso VR, Guarner F.** Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition* 109: S21–S26, 2013.

**Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A, Jung C, López-Requena A, Naert R, Steelant B, Luyts K, Plata C, De Vooght V, Vanoirbeek JAJ, Meseguer VM, Voets T, Alvarez JL, Hellings PW, Hoet PHM, Nemery B, Valverde MA, Talavera K.** TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. *Nat Commun* 8: 1059, 2017.

**Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, Trevisani M, Manni C, Geppetti P, McRoberts JA, Ennes H, Davis JB, Mayer EA, Bunnnett NW.** Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 24: 4300–4312, 2004.

**Angoa-Pérez M, Zagorac B, Francescutti DM, Winters AD, Greenberg JM, Ahmad MM, Manning SD, Gulbransen BD, Theis KR, Kuhn DM.** Effects of a high fat diet on gut microbiome dysbiosis in a mouse model of Gulf War Illness. *Sci Rep* 10: 9529, 2020.

**Annaházi A, Róka R, Rosztóczy A, Wittmann T.** Role of antispasmodics in the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 20: 6031–6043, 2014.

**Ansaldi E, Slayden LC, Ching KL, Koch MA, Wolf NK, Plichta DR, Brown EM, Graham DB, Xavier RJ, Moon JJ, Barton GM.** Akkermansia muciniphila induces intestinal adaptive immune responses during homeostasis. *Science* 364: 1179–1184, 2019.

**Arai S, Iwabuchi N, Takahashi S, Xiao J-Z, Abe F, Hachimura S.** Orally administered heat-killed *Lactobacillus paracasei* MCC1849 enhances antigen-specific IgA secretion and induces follicular helper T cells in mice. *PLoS One* 13: e0199018, 2018.

**Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, Wirth KJ, Okayasu I.** Effect of Icatibant, a Bradykinin B2 Receptor Antagonist, on the Development of Experimental Ulcerative Colitis in Mice. *Dig Dis Sci* 44: 845–851, 1999.

**Arora HC, Eng C, Shoskes DA.** Gut microbiome and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Ann Transl Med* 5: 30, 2017.

**Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, 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, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P.** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174–180, 2011.

**Arzani M, Jahromi SR, Ghorbani Z, Vahabizad F, Martelletti P, Ghaemi A, Sacco S, Togha M, On behalf of the School of Advanced Studies of the European Headache Federation (EHF-SAS).** Gut-brain Axis and migraine headache: a comprehensive review. *J Headache Pain* 21: 15, 2020.

**Augé C, Balz-Hara D, Steinhoff M, Vergnolle N, Cenac N.** Protease-activated receptor-4 (PAR 4): a role as inhibitor of visceral pain and hypersensitivity. *Neurogastroenterol Motil* 21: 1189-e107, 2009.

**Auteri M, Zizzo MG, Serio R.** GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation. *Pharmacological Research* 93: 11–21, 2015.

**Averina OV, Zorkina YA, Yunes RA, Kovtun AS, Ushakova VM, Morozova AY, Kostyuk GP, Danilenko VN, Chekhonin VP.** Bacterial Metabolites of Human Gut Microbiota Correlating with Depression. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 9234, 2020.

**Azpiroz F, Bouin M, Camilleri M, Mayer EA, Poitras P, Serra J, Spiller RC.** Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders. *Neurogastroenterol Motil* 19: 62–88, 2007.

**Bai T, Zhang L, Wang H, Qian W, Song J, Hou X.** Fecal Microbiota Transplantation Is Effective in Relieving Visceral Hypersensitivity in a Postinfectious Model. *BioMed Research International* 2018: e3860743, 2018.

**Bairamian D, Sha S, Rolhion N, Sokol H, Dorothée G, Lemere CA, Krantic S.** Microbiota in neuroinflammation and synaptic dysfunction: a focus on Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 17: 19, 2022.

**Balemans D, Aguiar Alpizar Y, Nasser Y, Moonen A, Cirillo C, Vanner S, Talavera Pérez K, Vanden Berghe P, Wouters M, Boeckxstaens G.** Evidence for histamine-mediated sensitization of TRPV1 signaling in sensory neurons in mice and IBS patients [Online]. In: *Gastroenterology*. Gastroenterology Digestive Disease Week, Date: 2014/05/03 - 2014/05/06, Location: Chicago. Elsevier, p. S220–S221. <https://lirias.kuleuven.be/437299> [26 Jul. 2021].

**Balemans D, Boeckxstaens GE, Talavera K, Wouters MM.** Transient receptor potential ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades underlying visceral hypersensitivity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 312: G635–G648, 2017.

**Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A.** Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41: 849–857, 2004.

**Barajon I, Serrao G, Arnaboldi F, Opizzi E, Ripamonti G, Balsari A, Rumio C.** Toll-like Receptors 3, 4, and 7 Are Expressed in the Enteric Nervous System and Dorsal Root Ganglia. *J Histochem Cytochem* 57: 1013–1023, 2009.

**Barañano KW, Hartman AL.** The ketogenic diet: uses in epilepsy and other neurologic illnesses. *Curr Treat Options Neurol* 10: 410–419, 2008.

**Barandouzi ZA, Starkweather AR, Henderson WA, Gyamfi A, Cong XS.** Altered Composition of Gut Microbiota in Depression: A Systematic Review [Online]. *Frontiers in Psychiatry* 11, 2020 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2020.00541> [1 Mar. 2022].

**Barbara G, Cremon C, De Giorgio R, Dothel G, Zecchi L, Bellacosa L, Carini G, Stanghellini V, Corinaldesi R.** Mechanisms Underlying Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 13: 308–315, 2011.

**Barbara G, Grover M, Bercik P, Corsetti M, Ghoshal UC, Ohman L, Rajilić-Stojanović M.** ROME FOUNDATION WORKING TEAM REPORT ON POST-INFECTION IRRITABLE BOWEL SYNDROME. *Gastroenterology* 156: 46-58.e7, 2019.

**Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R.** Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 132: 26–37, 2007.

**Barberio B, Zamani M, Black CJ, Savarino EV, Ford AC.** Prevalence of symptoms of anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 6: 359–370, 2021.

**Barden N.** Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci* 29: 185–193, 2004.

**Bascands J-L, Schanstra JP, Couture R, Girolami J-P.** Les récepteurs de la bradykinine : de nouveaux rôles physiopathologiques. *Med Sci (Paris)* 19: 1093–1100, 2003.

**Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, Orsi RH, Wiedmann M, McDonough P, Kim SG, Berg D, Schukken Y, Scherl E, Simpson KW.** Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *The ISME Journal* 1: 403–418, 2007.

**Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D.** TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* 124: 1269–1282, 2006.

**Becken B, Davey L, Middleton DR, Mueller KD, Sharma A, Holmes ZC, Dallow E, Remick B, Barton GM, David LA, McCann JR, Armstrong SC, Malkus P, Valdivia RH.** Genotypic and Phenotypic Diversity among Human Isolates of *Akkermansia muciniphila*. *mBio* 12: e00478-21, 2021.

**Bellais S, Nehlich M, Ania M, Duquenoy A, Mazier W, van den Engh G, Baijers J, Treichel NS, Clavel T, Belotserkovsky I, Thomas V.** Species-targeted sorting and cultivation of commensal bacteria from the gut microbiome using flow cytometry under anaerobic conditions. *Microbiome* 10: 24, 2022.

**Belsey JD, Geraint M, Dixon TA.** Systematic review and meta analysis: polyethylene glycol in adults with non-organic constipation. *International Journal of Clinical Practice* 64: 944–955, 2010.

**Bennet SM, Keshteli AH, Bercik P, Madsen KL, Reed D, Vanner SJ.** Application of metabolomics to the study of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility* 32: e13884, 2020.

**Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, Deng Y, Blennerhassett PA, Fahnestock M, Moine D, Berger B, Huizinga JD, Kunze W, McLean PG, Bergonzelli GE, Collins SM, Verdu EF.** The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol Motil* 23: 1132–1139, 2011.

**Berta T, Qadri Y, Tan P-H, Ji R-R.** Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21: 695–703, 2017.

**Bertin P, Vergne-Salle P.** Douleur et inflammation. *Revue du Rhumatisme* 86: A25–A29, 2019.

**Bian X, Wu W, Yang L, Lv L, Wang Q, Li Y, Ye J, Fang D, Wu J, Jiang X, Shi D, Li L.** Administration of *Akkermansia muciniphila* Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Front Microbiol* 10: 2259, 2019.

**Billings W, Mathur K, Craven HJ, Xu H, Shin A.** Potential Benefit With Complementary and Alternative Medicine in Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 19: 1538-1553.e14, 2021.

**Binienda A, Storr M, Fichna J, Salaga M.** Efficacy and Safety of Serotonin Receptor Ligands in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Review. *Current Drug Targets* 19: 1774–1781, 2018.

**Blake KJ, Baral P, Voisin T, Lubkin A, Pinho-Ribeiro FA, Adams KL, Roberson DP, Ma YC, Otto M, Woolf CJ, Torres VJ, Chiu IM.** Staphylococcus aureus produces pain through pore-forming toxins and neuronal TRPV1 that is silenced by QX-314. *Nature Communications* 9: 37, 2018.

**Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS, Miranda KR, Guimarães PLS, Santos-Filho J, Vieira JMBD, Barroso DE, Emond J-P, Ferreira EO, Paula GR, Domingues RMCP.** Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe* 16: 190–194, 2010.

**Bonaz B, Picq C, Sinniger V, Mayol JF, Clarençon D.** Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neurogastroenterology & Motility* 25: 208–221, 2013.

**Boonen B, Alpizar YA, Meseguer VM, Talavera K.** TRP Channels as Sensors of Bacterial Endotoxins. *Toxins* 10: 326, 2018.

**Bostock ECS, Kirkby KC, Taylor BVM.** The Current Status of the Ketogenic Diet in Psychiatry. *Front Psychiatry* 8: 43, 2017.

**Boudieu L, Mountadem S, Lashermes A, Meleine M, Ulmann L, Rassendren F, Aissouni Y, Sion B, Carvalho FA, Ardid D.** Blocking  $\alpha 2\delta$ -1 Subunit Reduces Bladder Hypersensitivity and Inflammation in a Cystitis Mouse Model by Decreasing NF-kB Pathway Activation [Online]. *Frontiers in Pharmacology* 10, 2019 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00133> [18 Jul. 2022].

**Brand M, Klusch A, Kurzai O, Valdeolmillos M, Schmidt RF, Petersen M.** No evidence for bradykinin B1 receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* 12: 3165–3168, 2001.

**Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF.** Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA

receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 16050–16055, 2011.

**Brehmer A.** Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 186: 1–91, 2006.

**Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, Vilas Boas PB, Chain F, Azevedo VA, Langella P, Chatel JM.** Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathway. *Front Microbiol* 8, 2017.

**Brierley SM, Linden DR.** Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 611–627, 2014.

**Brookes SJH.** Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical Record* 262: 58–70, 2001.

**Brookes SJH, Spencer NJ, Costa M, Zagorodnyuk VP.** Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 286–296, 2013.

**Brusberg M, Ravnefjord A, Martinsson R, Larsson H, Martínez V, Lindström E.** The GABAB receptor agonist, baclofen, and the positive allosteric modulator, CGP7930, inhibit visceral pain-related responses to colorectal distension in rats. *Neuropharmacology* 56: 362–367, 2009.

**Brüssow H.** Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microbial Biotechnology* 13: 423–434, 2020.

**Bueno-Notivol J, Gracia-García P, Olaya B, Lasheras I, López-Antón R, Santabárbara J.** Prevalence of depression during the COVID-19 outbreak: A meta-analysis of community-based studies. *International Journal of Clinical and Health Psychology* 21: 100196, 2021.

**Buhner S, Braak B, Li Q, Kugler EM, Klooker T, Wouters M, Donovan J, Vignali S, Mazzuoli-Weber G, Grundy D, Boeckxstaens G, Schemann M.** Neuronal activation by mucosal biopsy supernatants from irritable bowel syndrome patients is linked to visceral sensitivity. *Experimental Physiology* 99: 1299–1311, 2014.

**Burton MB, Gebhart GF.** Effects of intracolonic acetic acid on responses to colorectal distension in the rat. *Brain Research* 672: 77–82, 1995.

**Caenepeel C, Sadat Seyed Tabib N, Vieira-Silva S, Vermeire S.** Review article: how the intestinal microbiota may reflect disease activity and influence therapeutic outcome in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 52: 1453–1468, 2020.

**Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R.** Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470–1481, 2008.

**Cani PD, de Vos WM.** Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 8, 2017.

**Carlessi AS, Borba LA, Zugno AI, Quevedo J, Réus GZ.** Gut microbiota-brain axis in depression: The role of neuroinflammation. *Eur J Neurosci* 53: 222–235, 2021.

**Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, Turnbaugh PJ.** Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe* 17: 72–84, 2015.

**Carvalho FA, Koren O, Goodrich JK, Johansson MEV, Nalbantoglu I, Aitken JD, Su Y, Chassaing B, Walters WA, González A, Clemente JC, Cullender TC, Barnich N, Darfeuille-Michaud A, Vijay-Kumar M, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT.** Transient Inability to Manage Proteobacteria Promotes Chronic Gut Inflammation in TLR5-Deficient Mice. *Cell Host & Microbe* 12: 139–152, 2012.

**Castro J, Harrington AM, Hughes PA, Martin CM, Ge P, Shea CM, Jin H, Jacobson S, Hannig G, Mann E, Cohen MB, MacDougall JE, Lavins BJ, Kurtz CB, Silos-Santiago I, Johnston JM, Currie MG, Blackshaw LA, Brierley SM.** Linaclotide Inhibits Colonic Nociceptors and Relieves Abdominal Pain via Guanylate Cyclase-C and Extracellular Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate. *Gastroenterology* 145: 1334-1346.e11, 2013.

**Cattaruzza F, Spreadbury I, Miranda-Morales M, Grady EF, Vanner S, Bunnett NW.** Transient receptor potential ankyrin-1 has a major role in mediating visceral pain in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298: G81–G91, 2010.

**Cavaleri F, Bashar E.** Potential Synergies of  $\beta$ -Hydroxybutyrate and Butyrate on the Modulation of Metabolism, Inflammation, Cognition, and General Health. *J Nutr Metab* 2018: 7195760, 2018.

**Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, Kanner R, Bencosme Y, Lee YK, Hauser SL, Crabtree-Hartman E, Sand IK, Gacias M, Zhu Y, Casaccia P, Cree BAC, Knight R, Mazmanian SK, Baranzini SE.** Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 10713–10718, 2017.

**Cenac N.** Protease-Activated Receptors as Therapeutic Targets in Visceral Pain. *Curr Neuropharmacol* 11: 598–605, 2013.

**Cenac N, Altier C, Chapman K, Liedtke W, Zamponi G, Vergnolle N.** Transient receptor potential vanilloid-4 has a major role in visceral hypersensitivity symptoms. *Gastroenterology* 135: 937–946, 946.e1–2, 2008.

**Cenac N, Altier C, Motta J-P, d'Aldebert E, Galeano S, Zamponi GW, Vergnolle N.** Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity. *Gut* 59: 481–488, 2010.

**Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JGP, Shaffer E, Vergnolle N.** Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 117: 636–647, 2007.

**Cenac N, Bautzova T, Le Faouder P, Veldhuis NA, Poole DP, Rolland C, Bertrand J, Liedtke W, Dubourdeau M, Bertrand-Michel J, Zecchi L, Stanghellini V, Bunnett NW, Barbara G, Vergnolle N.** Quantification and Potential Functions of Endogenous Agonists of Transient Receptor Potential Channels in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 149: 433-444.e7, 2015.

**Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ.** Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior* 79: 359–371, 2003.

**Chandra R, Moore JWE.** The Surgical Options and Management of Intestinal Crohn's Disease. *Indian J Surg* 73: 432–438, 2011.

**Chandrasekharan B, Saeedi BJ, Alam A, Houser M, Srinivasan S, Tansey M, Jones R, Nusrat A, Neish AS.** Interactions Between Commensal Bacteria and Enteric Neurons, via FPR1 Induction of ROS, Increase Gastrointestinal Motility in Mice. *Gastroenterology* 0, 2019.

**Chang C-J, Lin T-L, Tsai Y-L, Wu T-R, Lai W-F, Lu C-C, Lai H-C.** Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of Food and Drug Analysis* 27: 615–622, 2019.

**Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M.** Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology* 104: 15.25.1-15.25.14, 2014.

**Chen J, Wang Q, Wang A, Lin Z.** Structural and Functional Characterization of the Gut Microbiota in Elderly Women With Migraine [Online]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, 2020<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00470> [9 Aug. 2022].

**Cheung SG, Goldenthal AR, Uhlemann A-C, Mann JJ, Miller JM, Sublette ME.** Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression [Online]. *Frontiers in Psychiatry* 10, 2019<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2019.00034> [9 May 2022].

**Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, Von Hehn CA, Zhao F, Tran J, Wainger B, Strominger A, Muralidharan S, Horswill AR, Wardenburg JB, Hwang SW, Carroll MC, Woolf CJ.** Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* 501: 52–57, 2013a.

**Chiu IM, Heesters BA, Ghasemlou N, Von Hehn CA, Zhao F, Tran J, Wainger B, Strominger A, Muralidharan S, Horswill AR, Wardenburg JB, Hwang SW, Carroll MC, Woolf CJ.** Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* 501: 52–57, 2013b.

**Choi S-I, Hwang SW.** Depolarizing Effectors of Bradykinin Signaling in Nociceptor Excitation in Pain Perception. *Biomol Ther (Seoul)* 26: 255–267, 2018.

**Chong PP.** The Microbiome and Irritable Bowel Syndrome – A Review on the Pathophysiology, Current Research and Future Therapy. *Frontiers in Microbiology* 10: 23, 2019.

**Chung S, Kim H, Kim D, Lee JM, Lee CJ, Oh SB.** Common bacterial metabolite indole directly activates nociceptive neuron through TRPA1 channel. *PAIN* , 2021. doi:10.1097/j.pain.0000000000002542.

**Cirulli F, Berry A, Alleva E.** Early disruption of the mother–infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27: 73–82, 2003.

**Clapham DE.** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517–524, 2003.

**Clos-Garcia M, Andrés-Marin N, Fernández-Eulate G, Abecia L, Lavín JL, van Liempd S, Cabrera D, Royo F, Valero A, Errazquin N, Vega MCG, Govillard L, Tackett MR, Tejada G, González E, Anguita J, Bujanda L, Orcasitas AMC, Aransay AM, Maíz O, López de Munain A, Falcón-Pérez JM.** Gut microbiome and serum metabolome analyses identify molecular biomarkers and altered glutamate metabolism in fibromyalgia. *EBioMedicine* 46: 499–511, 2019.

**Cohen M, Quintner J, van Rysewyk S.** Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain Rep* 3: e634, 2018.

**Cohen SP, Vase L, Hooten WM.** Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *The Lancet* 397: 2082–2097, 2021.

**Collins J, Borojevic R, Verdu EF, Huizinga JD, Ratcliffe EM.** Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 26: 98–107, 2014.

**Cook AD, Christensen AD, Tewari D, McMahon SB, Hamilton JA.** Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. *Trends in Immunology* 39: 240–255, 2018.

**Cordaillat-Simmons M, Rouanet A, Pot B.** Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework. *Exp Mol Med* 52: 1397–1406, 2020.

**Cordaillat-Simmons M, Rouanet A, Pot B.** Chapter 2 - Food or pharma: the name does make a difference. In: *Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases*, edited by Dwivedi MK, Amaresan N, Sankaranarayanan A, Kemp EH. Academic Press, p. 13–40.

**Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carlà V, Sili M, Cavone L, Maratea D, Moroni F.** G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology* 60: 1227–1231, 2011.

**Crouzet L, Gaultier E, Del’Homme C, Cartier C, Delmas E, Dapoigny M, Fioramonti J, Bernalier-Donadille A.** The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol Motil* 25: e272–e282, 2013.

**Cruz-Aguliar RM, Wantia N, Clavel T, Vehreschild MJGT, Buch T, Bajbouj M, Haller D, Busch D, Schmid RM, Stein-Thoeringer CK.** An Open-Labeled Study on Fecal Microbiota Transfer in Irritable Bowel Syndrome Patients Reveals Improvement in Abdominal Pain Associated with the Relative Abundance of *Akkermansia Muciniphila*. *DIG* 100: 127–138, 2019.

**Csekő K, Beckers B, Keszthelyi D, Helyes Z.** Role of TRPV1 and TRPA1 Ion Channels in Inflammatory Bowel Diseases: Potential Therapeutic Targets? *Pharmaceuticals* 12: 48, 2019.

**Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE.** Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International* 136: 109502, 2020.

**Cuffaro B, Assouhoun ALW, Boutillier D, Súkeníková L, Desramaut J, Boudebouze S, Salomé-Desnoulez S, Hrdý J, Waligora-Dupriet A-J, Maguin E, Grangette C.** In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of Parabacteroides distasonis Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells* 9: 2104, 2020.

**Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, Mancuso A, Mercade-Loubière M, Salvador-Cartier C, Gillet M, Ferrier L, Loubière P, Dague E, Theodorou V, Mercier-Bonin M.** Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307: G420-429, 2014.

**Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K.** Proteinase-Activated Receptor 2-Mediated Potentiation of Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1 Activity Reveals a Mechanism for Proteinase-Induced Inflammatory Pain. *J Neurosci* 24: 4293–4299, 2004.

**Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K.** Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest* 117: 1979–1987, 2007.

**Dalziel JE, Anderson RC, Peters JS, Lynch AT, Spencer NJ, Dekker J, Roy NC.** Promotility Action of the Probiotic Bifidobacterium lactis HN019 Extract Compared with Prucalopride in Isolated Rat Large Intestine [Online]. *Frontiers in Neuroscience* 11, 2017<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00020> [1 Feb. 2022].

**Daniels L, Philipszoon LE, Boermeester MA.** A Hypothesis: Important Role for Gut Microbiota in the Etiopathogenesis of Diverticular Disease. *Diseases of the Colon & Rectum* 57: 539–543, 2014.

**Darfeuille A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser L, Barnich N, Bringer A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel F.** High Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia coli Associated With Ileal Mucosa in Crohn's Disease. *Gastroenterology* 127: 10, 2004.

**Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF.** Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115: 1405–1413, 1998.

**David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ.** Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505: 559–563, 2014.

**Davis MP.** Drug management of visceral pain: concepts from basic research. *Pain Res Treat* 2012: 265605, 2012.

**De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, Bäckhed F.** Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 6458–6463, 2018.

**Decraecker L, Boeckxstaens G, Denadai-Souza A.** Inhibition of Serine Proteases as a Novel Therapeutic Strategy for Abdominal Pain in IBS. *Front Physiol* 13: 880422, 2022.

**Defaye M, Gervason S, Altier C, Berthon J-Y, Ardid D, Filaire E, Carvalho FA.** Microbiota: a novel regulator of pain. *Journal of Neural Transmission* , 2019. doi:10.1007/s00702-019-02083-z.

**Defaye M, Gervason S, Altier C, Berthon J-Y, Ardid D, Filaire E, Carvalho FA.** Microbiota: a novel regulator of pain. *J Neural Transm* 127: 445–465, 2020.

**Deiteren A, De Man JG, Ruysers NE, Moreels TG, Pelckmans PA, De Winter BY.** Histamine H4 and H1 receptors contribute to postinflammatory visceral hypersensitivity. *Gut* 63: 1873–1882, 2014.

**Deng J, Zhou F, Hou W, Silver Z, Wong CY, Chang O, Huang E, Zuo QK.** The prevalence of depression, anxiety, and sleep disturbances in COVID-19 patients: a meta-analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1486: 90–111, 2021.

**Deng L, Chiu IM.** Microbes and pain. *PLoS Pathog* 17: e1009398, 2021.

**Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, Falony G, Raes J, Maiter D, Delzenne NM, de Barse M, Loumaye A, Hermans MP, Thissen J-P, de Vos WM, Cani PD.** Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med* 25: 1096–1103, 2019.

**Devillier P.** Histamine, récepteurs de l’histamine et anti-histaminiques : données récentes. *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique* 44: 45–50, 2004.

**Dimidi E, Christodoulides S, Scott SM, Whelan K.** Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation<sup>12</sup>. *Adv Nutr* 8: 484–494, 2017.

**Dinan TG, Stanton C, Cryan JF.** Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biological Psychiatry* 74: 720–726, 2013.

**Diogenes A, Ferraz CCR, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM.** LPS Sensitizes TRPV1 via Activation of TLR4 in Trigeminal Sensory Neurons. *J Dent Res* 90: 759–764, 2011.

**Dionne J, Ford AC, Yuan Y, Chey WD, Lacy BE, Saito YA, Quigley EMM, Moayyedi P.** A Systematic Review and Meta-Analysis Evaluating the Efficacy of a Gluten-Free Diet and a Low FODMAPS Diet in Treating Symptoms of Irritable Bowel Syndrome. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 113: 1290–1300, 2018.

**Diop L, Raymond F, Fargeau H, Petoux F, Chovet M, Doherty AM.** Pregabalin (CI-1008) inhibits the trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colonic allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 1013–1022, 2002.

**Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R.** Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11971–11975, 2010.

**Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O’Connell TM, Bunger MK, Bultman SJ.** The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism* 13: 517–526, 2011.

**Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL.** A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67: 446–457, 2010.

**Drago L, Valentina C, Fabio P.** Gut microbiota, dysbiosis and colon lavage. *Dig Liver Dis* 51: 1209–1213, 2019.

**Dray X, Marteau P.** Maladie de Crohn et rectocolite hémorragique. *LA REVUE DU PRATICIEN* 57: 7, 2007.

**Dreher-Lesnack SM, Stibitz S, Carlson, Jr. PE.** U.S. Regulatory Considerations for Development of Live Biotherapeutic Products as Drugs. *Microbiology Spectrum* 5: 5.5.11, 2017.

**Drewes AM, Olesen AE, Farmer AD, Szigethy E, Rebours V, Olesen SS.** Gastrointestinal pain. *Nat Rev Dis Primers* 6: 1–16, 2020.

**Drokhlyansky E, Smillie CS, Van Wittenberghe N, Ericsson M, Griffin GK, Eraslan G, Dionne D, Cuoco MS, Goder-Reiser MN, Sharova T, Kuksenko O, Aguirre AJ, Boland GM, Graham D, Rozenblatt-Rosen O, Xavier RJ, Regev A.** The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution. *Cell* 182: 1606-1622.e23, 2020.

**Drossman DA.** Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. 150: 20, 2016.

**Du L, Long Y, Kim JJ, Chen B, Zhu Y, Dai N.** Protease Activated Receptor-2 Induces Immune Activation and Visceral Hypersensitivity in Post-infectious Irritable Bowel Syndrome Mice. *Dig Dis Sci* 64: 729–739, 2019.

**Du Y, Gao X-R, Peng L, Ge J-F.** Crosstalk between the microbiota-gut-brain axis and depression. *Heliyon* 6: e04097, 2020.

**Dubois NE, Gregory KE.** Characterizing the Intestinal Microbiome in Infantile Colic: Findings Based on an Integrative Review of the Literature. *Biological Research For Nursing* 18: 307–315, 2016.

**Duncan SH, Holtrop G, Lobleby GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ.** Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *British Journal of Nutrition* 91: 915–923, 2004.

**Duranti S.** Bifidobacterium adolescentis as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Scientific Reports* 13, 2020.

**Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA.** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635–1638, 2005.

**E. Dalziel J, Mohan V, Peters J, C. Anderson R, K. Gopal P, C. Roy N.** The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits propagating colonic contractions in the rat isolated large intestine. *Food & Function* 6: 256–263, 2015.

**Edogawa S, Edwinston AL, Peters SA, Chikkamenahalli LL, Sundt W, Graves S, Gurunathan SV, Breen-Lyles M, Johnson S, Dyer R, Graham R, Chen J, Kashyap P, Farrugia G, Grover M.** Serine proteases as luminal mediators of intestinal barrier dysfunction and symptom severity in IBS. *Gut* 69: 62–73, 2020.

**Enqi W, Jingzhu S, Lingpeng P, Yaqin L.** Comparison of the Gut Microbiota Disturbance in Rat Models of Irritable Bowel Syndrome Induced by Maternal Separation and Multiple Early-

Life Adversity [Online]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 2021 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.581974> [11 May 2022].

**Erickson A, Deiteren A, Harrington AM, Garcia-Caraballo S, Castro J, Caldwell A, Grundy L, Brierley SM.** Voltage-gated sodium channels: (NaV)igating the field to determine their contribution to visceral nociception. *J Physiol* 596: 785–807, 2018.

**Esquerre N, Basso L, Defaye M, Vicentini FA, Cluny N, Bihan D, Hirota SA, Schick A, Jijon HB, Lewis IA, Geuking MB, Sharkey KA, Altier C, Nasser Y.** Colitis-Induced Microbial Perturbation Promotes Postinflammatory Visceral Hypersensitivity. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 10: 225–244, 2020.

**Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Fitó M, Gea A, Hernán MA, Martínez-González MA, PREDIMED Study Investigators.** Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med* 378: e34, 2018.

**Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A.** Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 479–497, 2003.

**Farmer MA, Taylor AM, Bailey AL, Tuttle AH, MacIntyre LC, Milagrosa ZE, Crissman HP, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A, Binik YM, Mogil JS.** Repeated Vulvovaginal Fungal Infections Cause Persistent Pain in a Mouse Model of Vulvodynia. *Science Translational Medicine* 3: 101ra91-101ra91, 2011.

**Feagins LA, Cryer BL.** Do non-steroidal anti-inflammatory drugs cause exacerbations of inflammatory bowel disease? *Dig Dis Sci* 55: 226–232, 2010.

**Feehily C, Karatzas K a. G.** Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology* 114: 11–24, 2013.

**Felice D, O’Leary OF, Cryan JF.** Targeting the GABAB Receptor for the Treatment of Depression and Anxiety Disorders. In: *GABAB Receptor*, edited by Colombo G. Springer International Publishing, p. 219–250.

**Feng Z, Long W, Hao B, Ding D, Ma X, Zhao L, Pang X.** A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut Pathog* 9: 59, 2017.

**Ferraz CCR, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A.** Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *J Endod* 37: 45–48, 2011a.

**Ferraz CCR, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A.** Lipopolysaccharide From *Porphyromonas gingivalis* Sensitizes Capsaicin-Sensitive Nociceptors. *Journal of Endodontics* 37: 45–48, 2011b.

**Fichera A, Michelassi F.** Surgical Treatment of Crohn’s Disease. *J Gastrointest Surg* 11: 791–803, 2007.

**Fitzgerald CB, Shkoporov AN, Sutton TDS, Chaplin AV, Velayudhan V, Ross RP, Hill C.** Comparative analysis of *Faecalibacterium prausnitzii* genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics* 19: 931, 2018.

**Ford AC, Moayyedi P, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR, Soffer EE, Spiegel BMR, Quigley EMM, Disorders for the TF on the M of FB.** American College of Gastroenterology Monograph on the Management of Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic Constipation. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 109: S2, 2014.

**Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR.** Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *PNAS* 104: 13780–13785, 2007.

**Fried S, Wemelle E, Cani PD, Knauf C.** Interactions between the microbiota and enteric nervous system during gut-brain disorders. *Neuropharmacology* 197: 108721, 2021.

**Fukata M, Abreu MT.** Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 680–687, 2009.

**Fulla Y, Guignat L, Dugué M-A, Assié G, Bertagna X.** Exploration biologique de la fonction corticotrope. *Revue Francophone des Laboratoires* 2009: 35–48, 2009.

**Furness JB.** Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81: 87–96, 2000.

**Furness JB.** The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 286–294, 2012.

**Furness JB.** Enteric Nervous System: Structure, Relationships and Functions☆. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier, p. B9780128012383046000.

**Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N.** Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progress in Neurobiology* 72: 143–164, 2004.

**Galtier M, Sordi LD, Sivignon A, de Vallée A, Maura D, Neut C, Rahmouni O, Wannerberger K, Darfeuille-Michaud A, Desreumaux P, Barnich N, Debarbieux L.** Bacteriophages Targeting Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 11: 840–847, 2017.

**Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, Li T, Yin Y.** Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* 8: 13, 2018.

**Gasior M, Rogawski MA, Hartman AL.** Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet. *Behav Pharmacol* 17: 431–439, 2006.

**Gaudier E, Michel C, Segain J-P, Cherbut C, Hoebler C.** The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *J Nutr* 135: 2753–2761, 2005.

**Gaudreau G-A, Plourde V.** Involvement of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors in a rat model of visceral hypersensitivity. *Behavioural Brain Research* 150: 185–189, 2004.

**Geng Q, Zhang Q-E, Wang F, Zheng W, Ng CH, Ungvari GS, Wang G, Xiang Y-T.** Comparison of comorbid depression between irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: A meta-analysis of comparative studies. *Journal of Affective Disorders* 237: 37–46, 2018.

**Gensollen T, Blumberg RS.** Correlation between early life regulation of immune system by microbiota and allergy development. *J Allergy Clin Immunol* 139: 1084–1091, 2017.

**George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin H-S, Das G.** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* 26: 927–939, 2018.

**Gervason S, Defaye M, Ardid D, Berthon J-Y, Altier C, Filaire E, Carvalho FA.** Influence du microbiote sur la douleur. *Douleur analg* 34: 86–96, 2021.

**Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G.** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 491–502, 2017.

**Gladkevich A, Korf J, Hakobyan VP, Melkonyan KV.** The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Autonomic Neuroscience* 124: 1–8, 2006.

**Gobert AP, Sagrestani G, Delmas E, Wilson KT, Verriere TG, Dapoigny M, Del’homme C, Bernalier-Donadille A.** The human intestinal microbiota of constipated-predominant irritable bowel syndrome patients exhibits anti-inflammatory properties. *Sci Rep* 6: 39399, 2016.

**González-Arancibia C, Urrutia-Piñones J, Illanes-González J, Martínez-Pinto J, Sotomayor-Zárate R, Julio-Pieper M, Bravo JA.** Do your gut microbes affect your brain dopamine? *Psychopharmacology* 236: 1611–1622, 2019.

**Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen van Zanten SJO.** Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 4136–4141, 2006.

**Gorard DA, Libby GW, Farthing MJ.** Influence of antidepressants on whole gut and oro-caecal transit times in health and irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 8: 159–166, 1994.

**Gottesman-Katz L, Latorre R, Vanner S, Schmidt BL, Bunnett NW.** Targeting G protein-coupled receptors for the treatment of chronic pain in the digestive system. *Gut* 70: 970–981, 2021.

**Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T.** Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 101: 540–547, 1991.

**Groover AL, Ryals JM, Guilford BL, Wilson NM, Christianson JA, Wright DE.** Exercise-mediated improvements in painful neuropathy associated with prediabetes in mice. *Pain* 154: 2658–2667, 2013.

**Grundy L, Erickson A, Brierley SM.** Visceral Pain. *Annual Review of Physiology* 81: 261–284, 2019.

**Gschossmann JM, Liebrechts T, Adam B, Buenger L, Ruwe M, Gerken G, Holtmann G.** Long-term effects of transient chemically induced colitis on the visceromotor response to mechanical colorectal distension. *Dig Dis Sci* 49: 96–101, 2004.

**Guandalini S, Magazzù G, Chiaro A, La Balestra V, Di Nardo G, Gopalan S, Sibal A, Romano C, Canani RB, Lionetti P, Setty M.** VSL#3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51: 24–30, 2010.

**Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M.** Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* 30: 591–600, 2012.

**Guillot X, Semerano L, Decker P, Falgarone G, Boissier M-C.** Douleur et immunité. *Revue du Rhumatisme* 78: 503–511, 2011.

**Guo R, Chen L-H, Xing C, Liu T.** Pain regulation by gut microbiota: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British Journal of Anaesthesia* 123: 637–654, 2019.

**Gupta S, Mullish BH, Allegretti JR.** Fecal Microbiota Transplantation: The Evolving Risk Landscape. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 116: 647–656, 2021.

**Hamamah S, Aghazarian A, Nazaryan A, Hajnal A, Covasa M.** Role of Microbiota-Gut-Brain Axis in Regulating Dopaminergic Signaling. *Biomedicines* 10: 436, 2022.

**Hamieh AM, Mallaret G, Meleine M, Lashermes A, Roumeau S, Boudieu L, Barbier J, Aissouni Y, Ardid D, Gewirtz AT, Carvalho FA, Marchand F.** Toll-like receptor 5 knock-out mice exhibit a specific low level of anxiety. *Brain, Behavior, and Immunity* 93: 226–237, 2021.

**Hanack C, Moroni M, Lima WC, Wende H, Kirchner M, Adelfinger L, Schrenk-Siemens K, Tappe-Theodor A, Wetzell C, Kuich PH, Gassmann M, Roggenkamp D, Bettler B, Lewin GR, Selbach M, Siemens J.** GABA Blocks Pathological but Not Acute TRPV1 Pain Signals. *Cell* 160: 759–770, 2015.

**Hanevik K, Dizdar V, Langeland N, Hausken T.** Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterol* 9: 27, 2009.

**Hanning N, Edwinson AL, Ceuleers H, Peters SA, De Man JG, Hassett LC, De Winter BY, Grover M.** Intestinal barrier dysfunction in irritable bowel syndrome: a systematic review. *Therap Adv Gastroenterol* 14: 1756284821993586, 2021.

**Hansen J, Gulati A, Sartor RB.** The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria: *Current Opinion in Gastroenterology* 26: 564–571, 2010.

**Hasegawa Y, Chen S-Y, Sheng L, Jena PK, Kalanetra KM, Mills DA, Wan Y-JY, Slupsky CM.** Long-term effects of western diet consumption in male and female mice. *Sci Rep* 10: 14686, 2020.

**Hassan AM, Mancano G, Kashofer K, Fröhlich EE, Matak A, Mayerhofer R, Reichmann F, Olivares M, Neyrinck AM, Delzenne NM, Claus SP, Holzer P.** High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. *Nutr Neurosci* 22: 877–893, 2019.

**Hatoum-Aslan A.** Phage Genetic Engineering Using CRISPR–Cas Systems. *Viruses* 10: 335, 2018.

**Heiss CN, Olofsson LE.** The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. *Journal of Neuroendocrinology* 31: e12684, 2019.

**Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP.** Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 67: 5587–5596, 1999.

**Hiippala K, Kainulainen V, Suutarinen M, Heini T, Bowers JR, Jasso-Selles D, Lemmer D, Valentine M, Barnes R, Engelthaler DM, Satokari R.** Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing Bacteroides and Parabacteroides Spp. from A Healthy Fecal Donor. *Nutrients* 12: 935, 2020.

**Hill MJ.** Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 6 Suppl 1: S43–5, 1997.

**Hockley JRF, Boundouki G, Cibert-Goton V, McGuire C, Yip PK, Chan C, Tranter M, Wood JN, Nassar MA, Blackshaw LA, Aziz Q, Michael GJ, Baker MD, Winchester WJ, Knowles CH, Bulmer DC.** Multiple roles for NaV1.9 in the activation of visceral afferents by noxious inflammatory, mechanical, and human disease-derived stimuli. *Pain* 155: 1962–1975, 2014.

**Hockley JRF, Winchester WJ, Bulmer DC.** The voltage-gated sodium channel NaV 1.9 in visceral pain. *Neurogastroenterol Motil* 28: 316–326, 2016.

**Hoogerwerf WA, Zou L, Shenoy M, Sun D, Micci MA, Lee-Hellmich H, Xiao SY, Winston JH, Pasricha PJ.** The Proteinase-Activated Receptor 2 Is Involved in Nociception. *J Neurosci* 21: 9036–9042, 2001.

**Hosoi T, Okuma Y, Matsuda T, Nomura Y.** Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: Possible role of nodose ganglion. *Autonomic Neuroscience* 120: 104–107, 2005.

**Huang F, Wu X.** Brain Neurotransmitter Modulation by Gut Microbiota in Anxiety and Depression [Online]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, 2021 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.649103> [10 May 2022].

**Huang Y, Yang W, Liu H, Duan J, Zhang Y, Liu M, Li H, Hou Z, Wu KK.** Effect of high-dose methotrexate chemotherapy on intestinal Bifidobacteria, Lactobacillus and Escherichia coli in children with acute lymphoblastic leukemia. *Exp Biol Med (Maywood)* 237: 305–311, 2012.

**Hugon P, Dufour J-C, Colson P, Fournier P-E, Sallah K, Raoult D.** A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet Infectious Diseases* 15: 1211–1219, 2015.

**Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA.** A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One* 7: e34242, 2012.

**Ibrahim A, Ali RAR, Manaf MRA, Ahmad N, Tajurruddin FW, Qin WZ, Desa SHM, Ibrahim NM.** Multi-strain probiotics (Hexbio) containing MCP BCMC strains improved constipation and gut motility in Parkinson's disease: A randomised controlled trial. *PLOS ONE* 15: e0244680, 2020.

**Ingle P, Groothuis D, Rowe P, Huang H, Cockayne A, Kuehne SA, Jiang W, Gu Y, Humphreys CM, Minton NP.** Generation of a fully erythromycin-sensitive strain of *Clostridioides difficile* using a novel CRISPR-Cas9 genome editing system. *Sci Rep* 9: 8123, 2019.

**Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T.** Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 22: 56–63, 2003.

**Jaggari SI, Habib S, Rice ASC.** The modulatory effects of Bradykinin B1 and B2 receptor antagonists upon viscerovisceral hyper-reflexia in a rat model of visceral hyperalgesia. *Pain* 75: 169–176, 1998.

**Jalanka J, Lam C, Bennett A, Hartikainen A, Crispie F, Finnegan LA, Cotter PD, Spiller R.** Colonic Gene Expression and Fecal Microbiota in Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome: Increased Toll-like Receptor 4 but Minimal Inflammation and no Response to Mesalazine. *J Neurogastroenterol Motil* 27: 279–291, 2021.

**Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EMM, Simrén M.** An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61: 997–1006, 2012.

**Jhun J, Cho K-H, Lee D-H, Kwon JY, Woo JS, Kim J, Na HS, Park S-H, Kim SJ, Cho M-L.** Oral Administration of *Lactobacillus rhamnosus* Ameliorates the Progression of Osteoarthritis by Inhibiting Joint Pain and Inflammation. *Cells* 10: 1057, 2021.

**Ji S, Park H, Lee D, Song YK, Choi JP, Lee S-I.** Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with *Shigella* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 381–386, 2005.

**Jiang H, Zhang X, Yu Z, Zhang Z, Deng M, Zhao J, Ruan B.** Altered gut microbiota profile in patients with generalized anxiety disorder. *Journal of Psychiatric Research* 104: 130–136, 2018.

**Jimenez-Vargas NN, Pattison LA, Zhao P, Lieu T, Latorre R, Jensen DD, Castro J, Aurelio L, Le GT, Flynn B, Herenbrink CK, Yeatman HR, Edgington-Mitchell L, Porter CJH, Halls ML, Canals M, Veldhuis NA, Poole DP, McLean P, Hicks GA, Scheff N, Chen E, Bhattacharya A, Schmidt BL, Brierley SM, Vanner SJ, Bunnett NW.** Protease-activated receptor-2 in endosomes signals persistent pain of irritable bowel syndrome. *PNAS* 115: E7438–E7447, 2018.

**Johansson MEV, Jakobsson HE, Holmén-Larsson J, Schütte A, Ermund A, Rodríguez-Piñeiro AM, Arike L, Wising C, Svensson F, Bäckhed F, Hansson GC.** Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell Host Microbe* 18: 582–592, 2015.

**Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B.** Chapter Ten - The Pharmacology of Visceral Pain. In: *Advances in Pharmacology*, edited by Barrett JE. Academic Press, p. 273–301.

**Johnson CC, Ownby DR.** The infant gut bacterial microbiota and risk of pediatric asthma and allergic diseases. *Translational Research* 179: 60–70, 2017.

**Jones RCW, Xu L, Gebhart GF.** The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci* 25: 10981–10989, 2005.

**Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P, Vermeire S.** Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60: 631–637, 2011.

**Juruena MF, Eror F, Cleare AJ, Young AH.** The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. In: *Anxiety Disorders: Rethinking and Understanding Recent Discoveries*, edited by Kim Y-K. Springer, p. 141–153.

**Kaewpitak A, Bauer CS, Seward EP, Boissonade FM, Douglas CWI.** Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide rapidly activates trigeminal sensory neurons and may contribute to pulpal pain. *International Endodontic Journal* 53: 846–858, 2020.

**Kang D-W, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, Caporaso JG, Krajmalnik-Brown R.** Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep* 9: 5821, 2019.

**Kannan S, Krishnamoorthy G, Palanichamy P, Marudhamuthu M.** Role of Gut Microbiome in Neuromodulation. In: *Understanding Host-Microbiome Interactions - An Omics Approach: Omics of Host-Microbiome Association*, edited by Singh RP, Kothari R, Koringa PG, Singh SP. Springer, p. 105–122.

**Karanjia R, Spreadbury I, Bautista-Cruz F, Tsang ME, Vanner S.** Activation of protease-activated receptor-4 inhibits the intrinsic excitability of colonic dorsal root ganglia neurons. *Neurogastroenterol Motil* 21: 1218–1221, 2009.

**Karstens AJ, Tussing-Humphreys L, Zhan L, Rajendran N, Cohen J, Dion C, Zhou XJ, Lamar M.** Associations of the Mediterranean diet with cognitive and neuroimaging phenotypes of dementia in healthy older adults. *Am J Clin Nutr* 109: 361–368, 2019.

**Katanosaka K, Banik RK, Giron R, Higashi T, Tominaga M, Mizumura K.** Contribution of TRPV1 to the bradykinin-evoked nociceptive behavior and excitation of cutaneous sensory neurons. *Neuroscience Research* 62: 168–175, 2008.

**Kelly JR, Borre Y, O' Brien C, Patterson E, El Aidy S, Deane J, Kennedy PJ, Beers S, Scott K, Moloney G, Hoban AE, Scott L, Fitzgerald P, Ross P, Stanton C, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG.** Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of Psychiatric Research* 82: 109–118, 2016.

**Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G.** Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. *Neuropharmacology* 112: 399–412, 2017.

**Kierzkowska M, Majewska A, Mlynarczyk G.** Trends and Impact in Antimicrobial Resistance Among Bacteroides and Parabacteroides Species in 2007–2012 Compared to 2013–2017. *Microbial Drug Resistance* 26: 1452–1457, 2020.

**Kim D-W, Lee S-K, Ahn J.** Botulinum Toxin as a Pain Killer: Players and Actions in Antinociception. *Toxins* 7: 2435–2453, 2015.

**Knowles SR, Graff LA, Wilding H, Hewitt C, Keefer L, Mikocka-Walus A.** Quality of Life in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analyses—Part I. *Inflammatory Bowel Diseases* 24: 742–751, 2018a.

**Knowles SR, Keefer L, Wilding H, Hewitt C, Graff LA, Mikocka-Walus A.** Quality of Life in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analyses—Part II. *Inflammatory Bowel Diseases* 24: 966–976, 2018b.

**Koh GY, Kane AV, Wu X, Crott JW.** *Parabacteroides distasonis* attenuates tumorigenesis, modulates inflammatory markers and promotes intestinal barrier integrity in azoxymethane-treated A/J mice. *Carcinogenesis* 41: 909–917, 2020.

**Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Sokol D, Hudcovic T, Hrnecir T, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, Verdu EF, Tlaskalova-Hogenova H.** Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical & Experimental Immunology* 163: 250–259, 2011a.

**Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Sokol D, Hudcovic T, Hrnecir T, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, Verdu EF, Tlaskalova-Hogenova H.** Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical & Experimental Immunology* 163: 250–259, 2011b.

**La Fata G, Weber P, Mohajeri MH.** Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics & Antimicro Prot* 10: 11–21, 2018.

**La J-H, Kim T-W, Sung T-S, Kang J-W, Kim H-J, Yang I-S.** Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* 9: 2791–2795, 2003.

**Laird KT, Tanner-Smith EE, Russell AC, Hollon SD, Walker LS.** Comparative efficacy of psychological therapies for improving mental health and daily functioning in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Psychology Review* 51: 142–152, 2017.

**Lanza M, Campolo M, Casili G, Filippone A, Paterniti I, Cuzzocrea S, Esposito E.** Sodium Butyrate Exerts Neuroprotective Effects in Spinal Cord Injury. *Mol Neurobiol* 56: 3937–3947, 2019.

**Lapointe TK, Altier C.** The role of TRPA1 in visceral inflammation and pain. *Channels* 5: 525–529, 2011.

**Lapointe TK, Basso L, Iftinca MC, Flynn R, Chapman K, Dietrich G, Vergnolle N, Altier C.** TRPV1 sensitization mediates postinflammatory visceral pain following acute colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309: G87–G99, 2015.

**Laroute V, Beaufrand C, Gomes P, Nouaille S, Tondereau V, Daveran-Mingot M-L, Theodorou V, Eutamene H, Mercier-Bonin M, Coccagn-Bousquet M.** Lactococcus lactis NCDO2118 exerts visceral antinociceptive properties in rat via GABA production in the gastrointestinal tract. *eLife* 11: e77100, 2022.

**Lashermes A, Boudieu L, Barbier J, Sion B, Gelot A, Barnich N, Ardid D, Carvalho FA.** Adherent-Invasive E. coli enhances colonic hypersensitivity and P2X receptors expression during post-infectious period. *Gut Microbes* 9: 26–37, 2018.

**Laurans L, Taleb S.** Métabolisme du tryptophane et interactions avec le microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 56: 154–161, 2021.

**Laval L, Martin R, Natividad JN, Chain F, Miquel S, Desclée de Maredsous C, Capronnier S, Sokol H, Verdu EF, van Hylckama Vlieg JET, Bermúdez-Humarán LG, Smokvina T, Langella P.** Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 and the commensal bacterium Faecalibacterium prausnitzii A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut Microbes* 6: 1–9, 2015.

**Le Bars D, Willer J-C.** Physiologie de la douleur. *EMC - Anesthésie-Réanimation* 1: 227–266, 2004.

**Lecci A, Capriati A, Maggi CA.** Tachykinin NK2 receptor antagonists for the treatment of irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 141: 1249–1263, 2004.

**Lee S-H, Yoon J-M, Kim Y-H, Jeong D-G, Park S, Kang D-J.** Therapeutic effect of tyndallized Lactobacillus rhamnosus IDCC 3201 on atopic dermatitis mediated by down-regulation of immunoglobulin E in NC/Nga mice. *Microbiol Immunol* 60: 468–476, 2016.

**Legrand R, Lucas N, Dominique M, Azhar S, Deroissart C, Le Solliec M-A, Rondeaux J, Nobis S, Guérin C, Léon F, do Rego J-C, Pons N, Le Chatelier E, Ehrlich SD, Lambert G, Déchelotte P, Fetissov SO.** Commensal Hafnia alvei strain reduces food intake and fat mass in obese mice—a new potential probiotic for appetite and body weight management. *Int J Obes* 44: 1041–1051, 2020.

**Levy O.** Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7: 379–390, 2007.

**Ley RE, Gewirtz AT.** Corralling Colonic Flagellated Microbiota. *New England Journal of Medicine* 375: 85–87, 2016.

**Li Y-J, Dai C, Jiang M.** Mechanisms of Probiotic VSL#3 in a Rat Model of Visceral Hypersensitivity Involves the Mast Cell-PAR2-TRPV1 Pathway. *Dig Dis Sci* 64: 1182–1192, 2019.

**Lin Z, Wang Y, Lin S, Liu D, Mo G, Zhang H, Dou Y.** Identification of potential biomarkers for abdominal pain in IBS patients by bioinformatics approach. *BMC Gastroenterology* 21: 48, 2021.

**Liu D, Van Belleghem JD, de Vries CR, Burgener E, Chen Q, Manasherob R, Aronson JR, Amanatullah DF, Tamma PD, Suh GA.** The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies. *Viruses* 13: 1268, 2021.

**Liu RT, Walsh RFL, Sheehan AE.** Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 102: 13–23, 2019.

**Liu T, Xu Z-Z, Park C-K, Berta T, Ji R-R.** Toll-like receptor 7 mediates pruritus. *Nature Neuroscience* 13: 1460–1462, 2010.

**Liu W-H, Chuang H-L, Huang Y-T, Wu C-C, Chou G-T, Wang S, Tsai Y-C.** Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PS128 in germ-free mice. *Behav Brain Res* 298: 202–209, 2016.

**Loeza-Alcocer E, McPherson TP, Gold MS.** Peripheral GABA receptors regulate colonic afferent excitability and visceral nociception. *J Physiol* 597: 3425–3439, 2019.

**Lomax AE, Pradhananga S, Sessenwein JL, O'Malley D.** Bacterial modulation of visceral sensation: mediators and mechanisms. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 317: G363–G372, 2019.

**Lopez-Siles M, Enrich-Capó N, Aldeguer X, Sabat-Mir M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M.** Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8: 281, 2018.

**Louis P, Flint HJ.** Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* 19: 29–41, 2017.

**Loyd DR, Henry MA, Hargreaves KM.** Serotonergic neuromodulation of peripheral nociceptors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24: 51–57, 2013.

**Lucarini E, Di Pilato V, Parisio C, Micheli L, Toti A, Pacini A, Bartolucci G, Baldi S, Nicolai E, Amedei A, Rossolini GM, Nicoletti C, Cryan JF, O'Mahony SM, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L.** Visceral sensitivity modulation by faecal microbiota transplantation: the active role of gut bacteria in pain persistence. *PAIN* , 2021. doi:10.1097/j.pain.0000000000002438.

**Luna RA, Foster JA.** Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 35–41, 2015.

**Lund ML, Egerod KL, Engelstoft MS, Dmytriyeva O, Theodorsson E, Patel BA, Schwartz TW.** Enterochromaffin 5-HT cells - A major target for GLP-1 and gut microbial metabolites. *Mol Metab* 11: 70–83, 2018.

**Ma P, Mo R, Liao H, Qiu C, Wu G, Yang C, Zhang Y, Zhao Y, Song X-J.** Gut microbiota depletion by antibiotics ameliorates somatic neuropathic pain induced by nerve injury, chemotherapy, and diabetes in mice. *J Neuroinflammation* 19: 169, 2022.

**Ma X, Mao Y-K, Wang B, Huizinga JD, Bienenstock J, Kunze W.** *Lactobacillus reuteri* ingestion prevents hyperexcitability of colonic DRG neurons induced by noxious stimuli.

*American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296: G868–G875, 2009.

**Ma X, Sun Q, Sun X, Chen D, Wei C, Yu X, Liu C, Li Y, Li J.** Activation of GABAA Receptors in Colon Epithelium Exacerbates Acute Colitis. *Front Immunol* 9: 987, 2018.

**Machiels K, Joossens M, Sabino J, Preter VD, Arijs I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Immerseel FV, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S.** A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63: 1275–1283, 2014.

**Madsen AMA, Halkjær SI, Christensen AH, Günther S, Browne PD, Kallémose T, Hansen LH, Petersen AM.** The effect of faecal microbiota transplantation on abdominal pain, stool frequency, and stool form in patients with moderate-to-severe irritable bowel syndrome: results from a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Scand J Gastroenterol* 56: 761–769, 2021.

**Malcangio M.** GABAB receptors and pain. *Neuropharmacology* 136: 102–105, 2018.

**Mallaret G, Lashermes A, Meleine M, Boudieu L, Barbier J, Aissouni Y, Gelot A, Chassaing B, Gewirtz AT, Ardid D, Carvalho FA.** Involvement of toll-like receptor 5 in mouse model of colonic hypersensitivity induced by neonatal maternal separation. *World Journal of Gastroenterology* 28: 3903–3916, 2022.

**Mao Y-K, Kasper DL, Wang B, Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA.** *Bacteroides fragilis* polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons. *Nature Communications* 4: 1465, 2013.

**Marion E, Song O-R, Christophe T, Babonneau J, Fenistein D, Eyer J, Letournel F, Henrion D, Clere N, Paille V, Guérineau NC, Saint André J-P, Gersbach P, Altmann K-H, Stinear TP, Comoglio Y, Sandoz G, Preisser L, Delneste Y, Yeramian E, Marsollier L, Brodin P.** Mycobacterial Toxin Induces Analgesia in Buruli Ulcer by Targeting the Angiotensin Pathways. *Cell* 157: 1565–1576, 2014.

**Markowiak P, Śliżewska K.** Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 9: 1021, 2017.

**Marotto D, Atzeni F, Ardizzone S, Monteleone G, Giorgi V, Sarzi-Puttini P.** Extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel diseases. *Pharmacological Research* 161: 105206, 2020.

**Martín R, Langella P.** Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. *Frontiers in Microbiology* 10: 1047, 2019.

**Martín R, Laval L, Chain F, Miquel S, Natividad J, Cherbuy C, Sokol H, Verdu EF, van Hylckama Vlieg J, Bermudez-Humaran LG, Smokvina T, Langella P.** *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice [Online]. *Frontiers in Microbiology* 7, 2016 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00608> [19 Sep. 2022].

**Martín R, Miquel S, Benevides L, Bridonneau C, Robert V, Hudault S, Chain F, Berteau O, Azevedo V, Chatel JM, Sokol H, Bermúdez-Humarán LG, Thomas M, Langella P.**

Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic [Online]. *Frontiers in Microbiology* 8, 2017 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01226> [16 Aug. 2022].

**Martín R, Miquel S, Chain F, Natividad JM, Jury J, Lu J, Sokol H, Theodorou V, Bercik P, Verdu EF, Langella P, Bermúdez-Humarán LG.** *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol* 15: 67, 2015.

**Martin-Gallausiaux C, Larrauffie P, Jarry A, Béguet-Crespel F, Marinelli L, Ledue F, Reimann F, Blottière HM, Lapaque N.** Butyrate Produced by Commensal Bacteria Down-Regulates Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO-1) Expression via a Dual Mechanism in Human Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol* 9: 2838, 2018.

**Martin-Subero M, Anderson G, Kanchanatawan B, Berk M, Maes M.** Comorbidity between depression and inflammatory bowel disease explained by immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress; tryptophan catabolite; and gut–brain pathways. *CNS Spectrums* 21: 184–198, 2016.

**Maruyama K, Takayama Y, Sugisawa E, Yamanoi Y, Yokawa T, Kondo T, Ishibashi K, Sahoo BR, Takemura N, Mori Y, Kanemaru H, Kumagai Y, Martino MM, Yoshioka Y, Nishijo H, Tanaka H, Sasaki A, Ohno N, Iwakura Y, Moriyama Y, Nomura M, Akira S, Tominaga M.** The ATP Transporter VNUT Mediates Induction of Dectin-1-Triggered Candida Nociception. *iScience* 6: 306–318, 2018.

**Marx DM, Maye H, Abdelrahman K, Hessler R, Moschouri E, Aslan N, Godat S, Nichita C, Wiesel P, Perez L.** Maladies fonctionnelles digestives: mise au point concernant la classification Rome IV. *REVUE MÉDICALE SUISSE* 4, 2018.

**Matricon J, Gelot A, Ardid D.** Mécanismes périphériques et centraux de l'hypersensibilité viscérale. *Douleurs: Evaluation - Diagnostic - Traitement* 11: 65–74, 2010.

**Matsuda M, Huh Y, Ji R-R.** Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *J Anesth* 33: 131–139, 2019.

**Matsumoto K, Lo MW, Hosoya T, Tashima K, Takayama H, Murayama T, Horie S.** Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice. *Lab Invest* 92: 769–782, 2012.

**Matz EL, Hsieh MH.** Review of Advances in Uroprotective Agents for Cyclophosphamide- and Ifosfamide-induced Hemorrhagic Cystitis. *Urology* 100: 16–19, 2017.

**Mayorgas A, Dotti I, Salas A.** Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function. *Molecular Nutrition & Food Research* 65: 2000188, 2021.

**Mazier W, Le Corf K, Martinez C, Tudela H, Kissi D, Kropp C, Coubard C, Soto M, Elustondo F, Rawadi G, Claus SP.** A New Strain of *Christensenella minuta* as a Potential Biotherapy for Obesity and Associated Metabolic Diseases. *Cells* 10: 823, 2021.

**McCormick CM, Kehoe P, Kovacs S.** Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization. *Int J Dev Neurosci* 16: 175–185, 1998.

**McCusker RH, Kelley KW.** Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol* 216: 84–98, 2013.

**Mckernan DP, Fitzgerald P, Dinan TG, Cryan JF.** The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. *Neurogastroenterology and Motility* 22: 8, 2010.

**McVey Neufeld K-A, Strain CR, Pusceddu MM, Waworuntu RV, Manurung S, Gross G, M Moloney G, Hoban AE, Murphy K, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF, O'Mahony SM.** *Lactobacillus rhamnosus* GG soluble mediators ameliorate early life stress-induced visceral hypersensitivity and changes in spinal cord gene expression. *Neuronal Signal* 4: NS20200007, 2020.

**Meleine M, Boudieu L, Gelot A, Muller E, Lashermes A, Matricon J, Silberberg C, Theodorou V, Eschalier A, Ardid D, Carvalho FA.** Comparative effects of  $\alpha\delta$ -1 ligands in mouse models of colonic hypersensitivity. *World J Gastroenterol* 22: 7111–7123, 2016.

**Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M.** Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296: G1140–G1149, 2009.

**Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B, Fajardo O, Manenschijn J-A, Fernández-Peña C, Talavera A, Kichko T, Navia B, Sánchez A, Señarís R, Reeh P, Pérez-García MT, López-López JR, Voets T, Belmonte C, Talavera K, Viana F.** TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nature Communications* 5: 3125, 2014.

**Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Straube M, Daugey V, Modoux M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Borrás Nogues E, Godfraind C, Barnich N, Ardid D, Poirier P, Sokol H, Chatel J-M, Langella P, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.** AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes* 14: 2022997, 2022.

**Michielan A, D'Incà R.** Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators of Inflammation* 2015: e628157, 2015.

**Midenfjord I, Polster A, Sjövall H, Törnblom H, Simrén M.** Anxiety and depression in irritable bowel syndrome: Exploring the interaction with other symptoms and pathophysiology using multivariate analyses. *Neurogastroenterology & Motility* 31: e13619, 2019.

**Minerbi A, Gonzalez E, Brereton NJB, Anjarkouchian A, Dewar K, Fitzcharles M-A, Chevalier S, Shir Y.** Altered microbiome composition in individuals with fibromyalgia. *Pain* 160: 2589–2602, 2019.

**Miquel S, Martín R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, Eschalier A, Ardid D, Bermúdez-Humarán LG, Sokol H, Thomas M, Theodorou V, Langella P, Carvalho FA.** Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Scientific Reports* 6: 19399, 2016.

**Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán L, Chatel J, Sokol H, Thomas M, Wells J, Langella P.** Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology* 16: 255–261, 2013.

**Misra S, Mohanty D.** Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? *Crit Rev Food Sci Nutr* 59: 1230–1236, 2019.

**Mistry S, Paule CC, Varga A, Photiou A, Jenes A, Avelino A, Buluwela L, Nagy I.** Prolonged exposure to bradykinin and prostaglandin E2 increases TRPV1 mRNA but does not alter TRPV1 and TRPV1b protein expression in cultured rat primary sensory neurons. *Neuroscience Letters* 564: 89–93, 2014.

**Möhler H.** The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62: 42–53, 2012.

**Montassier E, Gastinne T, Vangay P, Al-Ghalith GA, Bruley des Varannes S, Massart S, Moreau P, Potel G, de La Cochetière MF, Batard E, Knights D.** Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther* 42: 515–528, 2015.

**Morgan V, Pickens D, Gautam S, Kessler R, Mertz H.** Amitriptyline reduces rectal pain related activation of the anterior cingulate cortex in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 54: 601–607, 2005.

**Morreale C, Bresesti I, Bosi A, Baj A, Giaroni C, Agosti M, Salvatore S.** Microbiota and Pain: Save Your Gut Feeling. *Cells* 11: 971, 2022.

**Morris G, Berk M, Carvalho A, Caso JR, Sanz Y, Walder K, Maes M.** The Role of the Microbial Metabolites Including Tryptophan Catabolites and Short Chain Fatty Acids in the Pathophysiology of Immune-Inflammatory and Neuroimmune Disease. *Mol Neurobiol* 54: 4432–4451, 2017.

**Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT.** Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *British Journal of Nutrition* 96: 570–577, 2006.

**Motavallian A, Bouzari S, Zamani E, Karimian P, Dabirian S, Molavi M, Torshkooh FA.** An investigation of the anti-inflammatory effects of gabapentin on acetic acid-induced colitis in rats. *Mol Biol Rep* 48: 3423–3430, 2021.

**Moussaoui N, Jacobs JP, Larauche M, Biraud M, Million M, Mayer E, Taché Y.** Chronic Early-life Stress in Rat Pups Alters Basal Corticosterone, Intestinal Permeability, and Fecal Microbiota at Weaning: Influence of Sex. *J Neurogastroenterol Motil* 23: 135–143, 2017.

**Moya-Pérez A, Perez-Villalba A, Benítez-Páez A, Campillo I, Sanz Y.** Bifidobacterium CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. *Brain Behav Immun* 65: 43–56, 2017.

**Mulhall H, DiChiara JM, Deragon M, Iyer R, Huck O, Amar S.** Akkermansia muciniphila and Its Pili-Like Protein Amuc\_1100 Modulate Macrophage Polarization in Experimental Periodontitis. *Infection and Immunity* 89: e00500-20, 2020.

**Mullineaux-Sanders C, Sanchez-Garrido J, Hopkins EGD, Shenoy AR, Barry R, Frankel G.** *Citrobacter rodentium* –host–microbiota interactions: immunity, bioenergetics and metabolism. *Nat Rev Microbiol* 17: 701–715, 2019.

**Mullish BH, Quraishi MN, Segal JP, McCune VL, Baxter M, Marsden GL, Moore D, Colville A, Bhala N, Iqbal TH, Settle C, Kontkowski G, Hart AL, Hawkey PM, Williams HR, Goldenberg SD.** The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *J Hosp Infect* 100 Suppl 1: S1–S31, 2018.

**Najjar SA, Davis BM, Albers KM.** Epithelial–Neuronal Communication in the Colon: Implications for Visceral Pain. *Trends in Neurosciences* 43: 170–181, 2020.

**Nakano V, Silva A do N e, Merino VRC, Wexler HM, Avila-Campos MJ.** Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal Bacteroidales strains. *Clinics* 66: 543–547, 2011.

**Nale JY, Redgwell TA, Millard A, Clokie MRJ.** Efficacy of an Optimised Bacteriophage Cocktail to Clear *Clostridium difficile* in a Batch Fermentation Model. *Antibiotics* 7: 13, 2018.

**Nanayakkara WS, Skidmore PM, O’Brien L, Wilkinson TJ, Gearry RB.** Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: the evidence to date. *Clin Exp Gastroenterol* 9: 131–142, 2016.

**Nath A, Bhattacharjee R, Nandi A, Sinha A, Kar S, Manoharan N, Mitra S, Mojumdar A, Panda PK, Patro S, Dutt A, Ahuja R, Verma SK, Suar M.** Phage delivered CRISPR-Cas system to combat multidrug-resistant pathogens in gut microbiome. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 151: 113122, 2022.

**Newman KM, Rank KM, Vaughn BP, Khoruts A.** Treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection using fecal microbiota transplantation in patients with inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 8: 303–309, 2017.

**Nguyen QN, Himes JE, Martinez DR, Permar SR.** The Impact of the Gut Microbiota on Humoral Immunity to Pathogens and Vaccination in Early Infancy. *PLOS Pathogens* 12: e1005997, 2016.

**Nicholson R, Small J, Dixon AK, Spanswick D, Lee K.** Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters* 337: 119–122, 2003.

**Nøhr MK, Pedersen MH, Gille A, Egerod KL, Engelstoft MS, Husted AS, Sichlau RM, Grunddal KV, Seier Poulsen S, Han S, Jones RM, Offermanns S, Schwartz TW.** GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as Cosensors for Short-Chain Fatty Acids in Enteroendocrine Cells vs FFAR3 in Enteric Neurons and FFAR2 in Enteric Leukocytes. *Endocrinology* 154: 3552–3564, 2013.

**Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, Kambal A, Monaco CL, Zhao G, Fleshner P, Stappenbeck TS, McGovern DPB, Keshavarzian A, Mutlu EA, Sauk J, Gevers D, Xavier RJ, Wang D, Parkes M, Virgin HW.** Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 160: 447–460, 2015.

**Norton C, Czuber-Dochan W, Artom M, Sweeney L, Hart A.** Systematic review: interventions for abdominal pain management in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 46: 115–125, 2017.

**Nozu T, Miyagishi S, Nozu R, Takakusaki K, Okumura T.** Butyrate inhibits visceral allodynia and colonic hyperpermeability in rat models of irritable bowel syndrome. *Scientific Reports* 9: 19603, 2019.

**Nyuyki KD, Cluny NL, Swain MG, Sharkey KA, Pittman QJ.** Altered Brain Excitability and Increased Anxiety in Mice With Experimental Colitis: Consideration of Hyperalgesia and Sex Differences [Online]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12, 2018 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2018.00058> [13 Sep. 2022].

**O’Mahony SM, Dinan TG, Cryan JF.** The gut microbiota as a key regulator of visceral pain. *PAIN* 158: S19, 2017.

**Obata Y, Castaño Á, Boeing S, Bon-Frauches AC, Fung C, Fallesen T, de Agüero MG, Yilmaz B, Lopes R, Huseynova A, Horswell S, Maradana MR, Boesmans W, Vanden Berghe P, Murray AJ, Stockinger B, Macpherson AJ, Pachnis V.** Neuronal programming by microbiota regulates intestinal physiology. *Nature* 578: 284–289, 2020.

**Ochoa-Cortes F, Ramos-Lomas T, Miranda-Morales M, Spreadbury I, Ibeakanma C, Barajas-Lopez C, Vanner S.** Bacterial cell products signal to mouse colonic nociceptive dorsal root ganglia neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G723–732, 2010.

**Ogilvie L, Jones B.** The human gut virome: a multifaceted majority [Online]. *Frontiers in Microbiology* 6, 2015 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00918> [8 Aug. 2022].

**Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH.** A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411: 603–606, 2001.

**Ohland CL, MacNaughton WK.** Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298: G807–G819, 2010.

**Oka P, Parr H, Barberio B, Black CJ, Savarino EV, Ford AC.** Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 5: 908–917, 2020.

**Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R.** A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98: 694–702, 1990.

**Olson CA, Vuong HE, Yano JM, Liang QY, Nusbaum DJ, Hsiao EY.** The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. *Cell* 173: 1728–1741.e13, 2018.

**O’Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF.** Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research* 277: 32–48, 2015.

**O'Mahony SM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF.** Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 71–88, 2011a.

**O'Mahony SM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF.** Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology* 214: 71–88, 2011b.

**Otaru N, Ye K, Mujezinovic D, Berchtold L, Constancias F, Cornejo FA, Krzystek A, de Wouters T, Braegger C, Lacroix C, Pugin B.** GABA Production by Human Intestinal Bacteroides spp.: Prevalence, Regulation, and Role in Acid Stress Tolerance. *Front Microbiol* 12: 656895, 2021.

**O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C.** Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2: 1–6, 2017.

**Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, Pietilä TE, Kainulainen V, Klievink J, Huuskonen L, Aalvink S, Skurnik M, Boeren S, Satokari R, Mercenier A, Palva A, Smidt H, Vos WM de, Belzer C.** Pili-like proteins of Akkermansia muciniphila modulate host immune responses and gut barrier function. *PLOS ONE* 12: e0173004, 2017a.

**Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, Pietilä TE, Kainulainen V, Klievink J, Huuskonen L, Aalvink S, Skurnik M, Boeren S, Satokari R, Mercenier A, Palva A, Smidt H, de Vos WM, Belzer C.** Pili-like proteins of Akkermansia muciniphila modulate host immune responses and gut barrier function. *PLOS ONE* 12: e0173004, 2017b.

**Paiva IHR, Duarte-Silva E, Peixoto CA.** The role of prebiotics in cognition, anxiety, and depression. *European Neuropsychopharmacology* 34: 1–18, 2020.

**Pan H, Fatima M, Li A, Lee H, Cai W, Horwitz L, Hor CC, Zaher N, Cin M, Slade H, Huang T, Xu XZS, Duan B.** Identification of a Spinal Circuit for Mechanical and Persistent Spontaneous Itch. *Neuron* 103: 1135-1149.e6, 2019.

**Pan Y, Chen X-Y, Zhang Q-Y, Kong L-D.** Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$ -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 41: 90–100, 2014.

**Paré P, Gray J, Lam S, Balshaw R, Khorasheh S, Barbeau M, Kelly S, McBurney CR.** Health-related quality of life, work productivity, and health care resource utilization of subjects with irritable bowel syndrome: Baseline results from logic (longitudinal outcomes study of gastrointestinal symptoms in Canada), a naturalistic study. *Clinical Therapeutics* 28: 1726–1735, 2006.

**Parkes GC, Rayment NB, Hudspith BN, Petrovska L, Lomer MC, Brostoff J, Whelan K, Sanderson JD.** Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome: Distinct mucosal microbiota in IBS. *Neurogastroenterology & Motility* 24: 31–39, 2012.

**Peirce JM, Alviña K.** The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety. *Journal of Neuroscience Research* 97: 1223–1241, 2019.

**Peng W, Jia Z, Gong Q.** [Current progress in neuroimaging research on treatment resistant depression]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 35: 794–798, 2018.

**Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Faouder PL, Galano J-M, Guy A, Knauf C, Tabet JC, Tronnet S, Barreau F, Heuillet M, Dietrich G, Bertrand-Michel J, Durand T, Oswald E, Cenac N.** Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nature Communications* 8: 1314, 2017.

**Perez-Burgos A, Wang L, McVey Neufeld K-A, Mao Y-K, Ahmadzai M, Janssen LJ, Stanisz AM, Bienenstock J, Kunze WA.** The TRPV1 channel in rodents is a major target for antinociceptive effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *J Physiol* 593: 3943–3957, 2015.

**Perez-Muñoz ME, Arrieta M-C, Ramer-Tait AE, Walter J.** A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 5: 48, 2017.

**Petersson J, Schreiber O, Hansson GC, Gendler SJ, Velcich A, Lundberg JO, Roos S, Holm L, Phillipson M.** Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G327-333, 2011.

**Petty F, Kramer GL, Gullion CM, John Rush A.** Low plasma  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in male patients with depression. *Biological Psychiatry* 32: 354–363, 1992.

**Picard E, Carvalho FA, Agosti F, Bourinet E, Ardid D, Eschalier A, Daulhac L, Mallet C.** Inhibition of Cav 3.2 calcium channels: A new target for colonic hypersensitivity associated with low-grade inflammation. *Br J Pharmacol* 176: 950–963, 2019.

**Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ.** 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70: 553–559, 1996.

**Pinard A, Seddik R, Bettler B.** GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol* 58: 231–255, 2010.

**Pinho-Ribeiro FA, Baddal B, Haarsma R, O’Seaghdha M, Yang NJ, Blake KJ, Portley M, Verri WA, Dale JB, Wessels MR, Chiu IM.** Blocking Neuronal Signaling to Immune Cells Treats Streptococcal Invasive Infection. *Cell* 173: 1083-1097.e22, 2018.

**Piqué N, Berlanga M, Miñana-Galbís D.** Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 2534, 2019.

**Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Vilchez-Padial LM, Gil A.** Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients* 9: 555, 2017.

**Plovier H, Cani PD.** *Akkermansia muciniphila*, une bactérie pour lutter contre le syndrome métabolique - Optimisation des effets bénéfiques et évaluation de la sûreté chez l’homme. *Med Sci (Paris)* 33: 373–375, 2017.

**Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KCH, Aalvink S, Martinez LO, Dumas M-E, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen J-P, Belzer C, de Vos WM, Cani PD.** A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine* 23: 107–113, 2017.

**Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, McGuckin MA, Florin THJ.** Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 105: 2420–2428, 2010.

**Poitras P, Poitras MR, Plourde V, Boivin M, Verrier P.** Evolution of Visceral Sensitivity in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Dig Dis Sci* 47: 914–920, 2002.

**Pokusaeva K, Johnson C, Luk B, Uribe G, Fu Y, Oezguen N, Matsunami RK, Lugo M, Major A, Mori-Akiyama Y, Hollister EB, Dann SM, Shi XZ, Engler DA, Savidge T, Versalovic J.** GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterol Motil* 29: e12904, 2017a.

**Pokusaeva K, Johnson C, Luk B, Uribe G, Fu Y, Oezguen N, Matsunami RK, Lugo M, Major A, Mori-Akiyama Y, Hollister EB, Dann SM, Shi XZ, Engler DA, Savidge T, Versalovic J.** GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterology & Motility* 29: e12904, 2017b.

**Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA.** Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *Journal of Surgical Research* 140: 12–19, 2007.

**Pouncey AL, Scott AJ, Alexander JL, Marchesi J, Kinross J.** Gut microbiota, chemotherapy and the host: the influence of the gut microbiota on cancer treatment. *Ecancermedicalscience* 12: 868, 2018.

**Poynard T, Regimbeau C, Benhamou Y.** Meta-analysis of smooth muscle relaxants in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 15: 355–361, 2001.

**Pradhananga S, Tashtush AA, Allen-Vercoe E, Petrof EO, Lomax AE.** Protease-dependent excitation of nodose ganglion neurons by commensal gut bacteria. *The Journal of Physiology* 598: 2137–2151, 2020.

**Presti AL, Chierico FD, Altomare A, Zorzi F, Cella E, Putignani L, Luca Guarino MP, Monteleone G, Cicala M, Angeletti S, Ciccozzi M.** Exploring the genetic diversity of the 16S rRNA gene of *Akkermansia muciniphila* in IBD and IBS. *Future Microbiology* 14: 1497–1509, 2019.

**Pujo J, Petitfils C, Faouder PL, Eeckhaut V, Payros G, Maurel S, Perez-Berezo T, Hul MV, Barreau F, Blanpied C, Chavanas S, Immerseel FV, Bertrand-Michel J, Oswald E, Knauf C, Dietrich G, Cani PD, Cenac N.** Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis. *Gut* 70: 1088–1097, 2021.

**Qian A, Song D, Li Y, Liu X, Tang D, Yao W, Yuan Y.** Role of Voltage Gated Ca<sup>2+</sup> Channels in Rat Visceral Hypersensitivity Change Induced by 2, 4, 6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid. *Mol Pain* 9: 1744-8069-9–15, 2013.

**Qin H, Luo J, Qi S, Xu H, Sung JJY, Bian Z.** Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon. *Eur J Pharmacol* 647: 75–83, 2010a.

**Qin H-Y, Wu JCY, Tong X-D, Sung JJY, Xu H-X, Bian Z-X.** Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 46: 164–174, 2011.

**Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto J-M, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J.** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65, 2010b.

**Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermúdez-Humarán LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill J-P, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P.** Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65: 415–425, 2016a.

**Quévrain E, Maubert M-A, Sokol H, Devreese B, Seksik P.** The presence of the anti-inflammatory protein MAM, from *Faecalibacterium prausnitzii*, in the intestinal ecosystem. *Gut* 65: 882–882, 2016b.

**Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, Moore D, Price M, Sharma N, Iqbal TH.** Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 46: 479–493, 2017.

**Rajilic M, Biagi E, Tims S, Vos WMD.** Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From Patients With Irritable Bowel Syndrome. 141: 10, 2011.

**Rajilić–Stojanović M, Biagi E, Heilig HGJ, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, de Vos WM.** Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 141: 1792–1801, 2011.

**Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM.** Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis* 19: 481–488, 2013.

**Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P.** Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr* 101: 541–550, 2009.

**Rawat K, Singh N, Kumari P, Saha L.** A review on preventive role of ketogenic diet (KD) in CNS disorders from the gut microbiota perspective. *Rev Neurosci* 32: 143–157, 2021.

**Regueiro M, Greer JB, Szigethy E.** Etiology and Treatment of Pain and Psychosocial Issues in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 152: 430-439.e4, 2017.

**Resta F, Masi A, Sili M, Laurino A, Moroni F, Mannaioni G.** Kynurenic acid and zaprinast induce analgesia by modulating HCN channels through GPR35 activation. *Neuropharmacology* 108: 136–143, 2016.

**Riba A, Olier M, Lacroix-Lamandé S, Lencina C, Bacquié V, Harkat C, Gillet M, Baron M, Sommer C, Mallet V, Salvador-Cartier C, Laurent F, Théodorou V, Ménard S.** Paneth Cell Defects Induce Microbiota Dysbiosis in Mice and Promote Visceral Hypersensitivity. *Gastroenterology* 153: 1594-1606.e2, 2017.

**Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ.** The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. *Trends in Microbiology* 27: 131–147, 2019.

**Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, Argollo M, Panaccione R, Spinelli A, Kaser A, Peyrin-Biroulet L, Danese S.** Crohn’s disease. *Nat Rev Dis Primers* 6: 1–19, 2020.

**Roman P, Estévez AF, Miras A, Sánchez-Labraca N, Cañadas F, Vivas AB, Cardona D.** A Pilot Randomized Controlled Trial to Explore Cognitive and Emotional Effects of Probiotics in Fibromyalgia. *Sci Rep* 8: 10965, 2018.

**Rong W, Keating C, Sun B, Dong L, Grundy D.** Purinergic contribution to small intestinal afferent hypersensitivity in a murine model of postinfectious bowel disease. *Neurogastroenterol Motil* 21: 665–671, e32, 2009.

**de Roos NM, Giezenaar CGT, Rovers JMP, Witteman BJM, Smits MG, van Hemert S.** The effects of the multispecies probiotic mixture Ecologic®Barrier on migraine: results of an open-label pilot study. *Benef Microbes* 6: 641–646, 2015.

**Rossi O, Khan MT, Schwarzer M, Hudcovic T, Srutkova D, Duncan SH, Stolte EH, Kozakova H, Flint HJ, Samsom JN, Harmsen HJM, Wells JM.** Faecalibacterium prausnitzii Strain HTF-F and Its Extracellular Polymeric Matrix Attenuate Clinical Parameters in DSS-Induced Colitis. *PLOS ONE* 10: e0123013, 2015.

**Rouanet A, Bolca S, Bru A, Claes I, Cvejic H, Girgis H, Harper A, Lavergne SN, Mathys S, Pane M, Pot B, Shortt C, Alkema W, Bezulowsky C, Blanquet-Diot S, Chassard C, Claus SP, Hadida B, Hemmingsen C, Jeune C, Lindman B, Midzi G, Mogna L, Movitz C, Nasir N, Oberreither M, Seegers JFML, Sterkman L, Valo A, Vieville F, Cordaillat-Simmons M.** Live Biotherapeutic Products, A Road Map for Safety Assessment [Online]. *Frontiers in Medicine* 7, 2020<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.00237> [11 Jul. 2022].

**Ruhl CR, Pasko BL, Khan HS, Kindt LM, Stamm CE, Franco LH, Hsia CC, Zhou M, Davis CR, Qin T, Gautron L, Burton MD, Mejia GL, Naik DK, Dussor G, Price TJ, Shiloh MU.** Mycobacterium tuberculosis Sulfolipid-1 Activates Nociceptive Neurons and Induces Cough. *Cell* 181: 293-305.e11, 2020.

**Saarela MH.** Safety aspects of next generation probiotics. *Current Opinion in Food Science* 30: 8–13, 2019.

**Sadeghi M, Erickson A, Castro J, Deiteren A, Harrington AM, Grundy L, Adams DJ, Brierley SM.** Contribution of membrane receptor signalling to chronic visceral pain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 98: 10–23, 2018.

**Sagami Y, Shimada Y, Tayama J, Nomura T, Satake M, Endo Y, Shoji T, Karahashi K, Hongo M, Fukudo S.** Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 53: 958–964, 2004.

**Sang L-X, Chang B, Dai C, Gao N, Liu W-X, Jiang M.** Heat-killed VSL#3 Ameliorates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Experimental Colitis in Rats. *Int J Mol Sci* 15: 15–28, 2013.

**Sangster W, Hegarty JP, Stewart DB.** Phage therapy for *Clostridium difficile* infection: An alternative to antibiotics? *Seminars in Colon and Rectal Surgery* 25: 167–170, 2014.

**Saviano A, Brigida M, Migneco A, Gunawardena G, Zanza C, Candelli M, Franceschi F, Ojetti V.** *Lactobacillus Reuteri* DSM 17938 (*Limosilactobacillus reuteri*) in Diarrhea and Constipation: Two Sides of the Same Coin? *Medicina* 57: 643, 2021.

**Savitz J, Drevets WC, Wurfel BE, Ford BN, Bellgowan PSF, Victor TA, Bodurka J, Teague TK, Dantzer R.** Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity* 46: 55–59, 2015.

**Schrezenmeir J, de Vrese M.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 361s–364s, 2001.

**Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G.** Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 9: E1063, 2017.

**Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB.** Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90: 859–904, 2010.

**Sender R, Fuchs S, Milo R.** Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164: 337–340, 2016.

**Seong G, Lee S, Min YW, Jang YS, Park S-Y, Kim C-H, Lee C, Hong SN, Chang DK.** Effect of a Synbiotic Containing *Lactobacillus paracasei* and *Opuntia humifusa* on a Murine Model of Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients* 12: 3205, 2020.

**Seretny M, Currie GL, Sena ES, Ramnarine S, Grant R, MacLeod MR, Colvin LA, Fallon M.** Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 155: 2461–2470, 2014.

**Sessenwein JL, Baker CC, Pradhananga S, Maitland ME, Petrof EO, Allen-Vercoe E, Noordhof C, Reed DE, Vanner SJ, Lomax AE.** Protease-Mediated Suppression of DRG Neuron Excitability by Commensal Bacteria. *J Neurosci* 37: 11758–11768, 2017.

**Sharon G, Garg N, Debelius J, Knight R, Dorrestein PC, Mazmanian SK.** Specialized Metabolites from the Microbiome in Health and Disease. *Cell Metabolism* 20: 719–730, 2014.

**Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK.** The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* 167: 915–932, 2016.

**Shen S, Lim G, You Z, Ding W, Huang P, Ran C, Doheny J, Caravan P, Tate S, Hu K, Kim H, McCabe M, Huang B, Xie Z, Kwon D, Chen L, Mao J.** Gut microbiota is critical for the induction of chemotherapy-induced pain. *Nat Neurosci* 20: 1213–1216, 2017.

**Shiha MG, Aziz I.** Review article: Physical and psychological comorbidities associated with irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 54: S12–S23, 2021.

**Simon E, Călinoiu LF, Mitrea L, Vodnar DC.** Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Implications and Beneficial Effects against Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients* 13: 2112, 2021.

**Simrén M, Ringström G, Björnsson ES, Abrahamsson H.** Treatment with hypnotherapy reduces the sensory and motor component of the gastrocolonic response in irritable bowel syndrome. *Psychosom Med* 66: 233–238, 2004.

**Simrén M, Tack J.** New treatments and therapeutic targets for IBS and other functional bowel disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15: 589–605, 2018.

**Singh J, Metrani R, Shivanagoudra SR, Jayaprakasha GK, Patil BS.** Review on Bile Acids: Effects of the Gut Microbiome, Interactions with Dietary Fiber, and Alterations in the Bioaccessibility of Bioactive Compounds. *J Agric Food Chem* 67: 9124–9138, 2019.

**Sinopoulou V, Gordon M, Dovey TM, Akobeng AK.** Interventions for the management of abdominal pain in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* , 2021. doi:10.1002/14651858.CD013589.pub2.

**Skrzydło-Radomańska B, Prozorow-Król B, Cichoż-Lach H, Majsiak E, Bierla JB, Kosikowski W, Szczerbiński M, Gantzel J, Cukrowska B.** The Effectiveness of Synbiotic Preparation Containing Lactobacillus and Bifidobacterium Probiotic Strains and Short Chain Fructooligosaccharides in Patients with Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome—A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients* 12: 1999, 2020.

**Smith KS, Greene MW, Babu JR, Frugé AD.** Psychobiotics as treatment for anxiety, depression, and related symptoms: a systematic review. *Nutritional Neuroscience* 0: 1–15, 2019.

**Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Goldstein EJC, Harrell L, Jenkins SG, Newton D, Patel R, Hecht DW.** Trends in antimicrobial resistance among Bacteroides species and Parabacteroides species in the United States from 2010–2012 with comparison to 2008–2009. *Anaerobe* 43: 21–26, 2017.

**Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J.** Low Counts of Faecalibacterium prausnitzii in Colitis Microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases* 15: 1183–1189, 2009.

**Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Doré J.** Specificities of the Fecal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 12: 106–111, 2006.

**Southgate EL, He RL, Gao J-L, Murphy PM, Nanamori M, Ye RD.** Identification of Formyl Peptides from Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus as Potent Chemoattractants for Mouse Neutrophils. *The Journal of Immunology* 181: 1429–1437, 2008.

**Souza Monteiro de Araujo D, Nassini R, Geppetti P, De Logu F.** TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 24: 997–1008, 2020.

**Spiller R, Garsed K.** Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 136: 1979–1988, 2009.

**Stadnicki A, Pastucha E, Nowaczyk G, Mazurek U, Plewka D, Machnik G, Wilczok T, Colman RW.** Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G361-366, 2005.

**Stanisor OI, van Diest SA, Yu Z, Welting O, Bekkali N, Shi J, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE, van den Wijngaard RM.** Stress-induced visceral hypersensitivity in maternally separated rats can be reversed by peripherally restricted histamine-1-receptor antagonists. *PLoS One* 8: e66884, 2013.

**Steck N, Mueller K, Schemann M, Haller D.** Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* 61: 1610–1618, 2012.

**Stovner LJ, Nichols E, Steiner TJ, Abd-Allah F, Abdelalim A, Al-Raddadi RM, Ansha MG, Barac A, Bensenor IM, Doan LP, Edessa D, Endres M, Foreman KJ, Gankpe FG, Gopalkrishna G, Goulart AC, Gupta R, Hankey GJ, Hay SI, Hegazy MI, Hilawe EH, Kasaeian A, Kassa DH, Khalil I, Khang Y-H, Khubchandani J, Kim YJ, Kokubo Y, Mohammed MA, Mokdad AH, Moradi-Lakeh M, Nguyen HLT, Nirayo YL, Qorbani M, Ranta A, Roba KT, Safiri S, Santos IS, Satpathy M, Sawhney M, Shiferaw MS, Shiue I, Smith M, Szeke CEI, Truong NT, Venketasubramanian N, Weldegwergs K gidey, Westerman R, Wijeratne T, Tran BX, Yonemoto N, Feigin VL, Vos T, Murray CJL.** Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 17: 954–976, 2018.

**Strandwitz P.** Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research* 1693: 128–133, 2018.

**Stuart MJ, Baune BT.** Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: A systematic review of biomarker studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 42: 93–115, 2014.

**Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM.** NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G1298-1306, 2000.

**Stuivenberg GA, Burton JP, Bron PA, Reid G.** Why Are Bifidobacteria Important for Infants? *Microorganisms* 10: 278, 2022.

**Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, Kubo C, Koga Y.** Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558: 263–275, 2004.

**Sugahara H, Yao R, Odamaki T, Xiao JZ.** Differences between live and heat-killed bifidobacteria in the regulation of immune function and the intestinal environment. *Benef Microbes* 8: 463–472, 2017.

**Sugiuar T, Bielefeldt K, Gebhart GF.** TRPV1 Function in Mouse Colon Sensory Neurons Is Enhanced by Metabotropic 5-Hydroxytryptamine Receptor Activation. *J Neurosci* 24: 9521–9530, 2004.

**Szigethy E.** Pain Management in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 14: 53–56, 2018.

**Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A.** Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn’s Disease. *Digestion* 93: 59–65, 2016.

**Takeda K, Akira S.** Toll-Like Receptors. *Current Protocols in Immunology* 77: 14.12.1-14.12.13, 2007.

**Takemura Y, Furuta S, Hirayama S, Miyashita K, Imai S, Narita M, Kuzumaki N, Tsukiyama Y, Yamazaki M, Suzuki T, Narita M.** Upregulation of bradykinin receptors is implicated in the pain associated with caerulein-induced acute pancreatitis. *Synapse* 65: 608–616, 2011.

**Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS.** Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* 5: e1373208, 2017.

**Tan H, Wang C, Zhang Q, Tang X, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W.** Preliminary safety assessment of a new *Bacteroides fragilis* isolate. *Food and Chemical Toxicology* 135: 110934, 2020a.

**Tan P, Li X, Shen J, Feng Q.** Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Front Pharmacol* 11: 574533, 2020b.

**tana c., umesaki y., imaoka a., handa t., kanazawa m., fukudo s.** Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility*, 2009. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x.

**Tanaka M, Nakayama J.** Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergology International* 66: 515–522, 2017.

**Tang Y, Liu S, Shu H, Yanagisawa L, Tao F.** Gut Microbiota Dysbiosis Enhances Migraine-Like Pain Via TNF $\alpha$  Upregulation. *Mol Neurobiol* 57: 461–468, 2020.

**Tao J, McCourt C, Sultana H, Nelson C, Driver J, Hackmann TJ.** Use of a Fluorescent Analog of Glucose (2-NBDG) To Identify Uncultured Rumen Bacteria That Take Up Glucose. *Appl Environ Microbiol* 85: e03018-18, 2019.

**Tap J, Derrien M, Törnblom H, Brazeilles R, Cools-Portier S, Doré J, Störsrud S, Le Nevé B, Öhman L, Simrén M.** Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 152: 111-123.e8, 2017.

**Taverniti V, Guglielmetti S.** The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* 6: 261–274, 2011.

**Tette F-M, Kwofie SK, Wilson MD.** Therapeutic Anti-Depressant Potential of Microbial GABA Produced by *Lactobacillus rhamnosus* Strains for GABAergic Signaling Restoration and Inhibition of Addiction-Induced HPA Axis Hyperactivity. *Current Issues in Molecular Biology* 44: 1434–1451, 2022.

**Thakur BK, Saha P, Banik G, Saha DR, Grover S, Batish VK, Das S.** Live and heat-killed probiotic *Lactobacillus casei* Lbs2 protects from experimental colitis through Toll-like receptor 2-dependent induction of T-regulatory response. *International Immunopharmacology* 36: 39–50, 2016.

**van Thiel IAM, Botschuijver S, de Jonge WJ, Seppen J.** Painful interactions: Microbial compounds and visceral pain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866: 165534, 2020.

**Thomas AS, Lin P.** Ocular manifestations of inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Ophthalmology* 27: 552–560, 2016.

**Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Hudcovic T, Tučková L, Cukrowska B, Lodinová-Žádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Řeháková Z, Šinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokešová A.** Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters* 93: 97–108, 2004.

**Tramullas M, Finger BC, Dinan TG, Cryan JF.** Obesity Takes Its Toll on Visceral Pain: High-Fat Diet Induces Toll-Like Receptor 4-Dependent Visceral Hypersensitivity. *PLOS ONE* 11: e0155367, 2016.

**Treede R-D, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Finnerup NB, First MB, Giamberardino MA, Kaasa S, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Perrot S, Scholz J, Schug S, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JWS, Wang S-J.** A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* 156: 1003–1007, 2015.

**Troy EB, Kasper DL.** Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. *Front Biosci* 15: 25–34, 2010.

**Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TA, Netrusov AI.** Hormones and hormone-like substances of microorganisms: A review. *Appl Biochem Microbiol* 42: 229–235, 2006.

**Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G, Caprioli F, Sonzogni A, Viale G, Rescigno M.** Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61: 1007–1015, 2012.

**Tsivgoulis G, Psaltopoulou T, Wadley VG, Alexandrov AV, Howard G, Unverzagt FW, Moy C, Howard VJ, Kissela B, Judd SE.** Adherence to a Mediterranean diet and prediction of incident stroke. *Stroke* 46: 780–785, 2015.

**Tsuda MC, Ogawa S.** Long-Lasting Consequences of Neonatal Maternal Separation on Social Behaviors in Ovariectomized Female Mice. *PLOS ONE* 7: e33028, 2012.

**Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI.** The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine* 1: 6ra14-6ra14, 2009.

**Uhlig F, Grundy L, Garcia-Caraballo S, Brierley SM, Foster SJ, Grundy D.** Identification of a Quorum Sensing-Dependent Communication Pathway Mediating Bacteria-Gut-Brain Cross Talk. *iScience* 23: 101695, 2020.

**Uhlig HH, Powrie F.** Translating Immunology into Therapeutic Concepts for Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol* 36: 755–781, 2018.

**Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC.** Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *The Journal of Nutrition* 141: 769–776, 2011.

**Valles-Colomer M, Falony G, Darzi Y, Tigchelaar EF, Wang J, Tito RY, Schiweck C, Kurilshikov A, Joossens M, Wijmenga C, Claes S, Van Oudenhove L, Zhernakova A, Vieira-Silva S, Raes J.** The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat Microbiol* 4: 623–632, 2019.

**Vangay P, Ward T, Gerber JS, Knights D.** Antibiotics, Pediatric Dysbiosis, and Disease. *Cell Host & Microbe* 17: 553–564, 2015.

**Vanhoutvin S a. LW, Troost FJ, Kilkens TOC, Lindsey PJ, Hamer HM, Jonkers DM a. E, Venema K, Brummer R -j M.** The effects of butyrate enemas on visceral perception in healthy volunteers. *Neurogastroenterology & Motility* 21: 952-e76, 2009.

**Veldhuis NA, Poole DP, Grace M, McIntyre P, Bunnett NW.** The G Protein-Coupled Receptor-Transient Receptor Potential Channel Axis: Molecular Insights for Targeting Disorders of Sensation and Inflammation. *Pharmacol Rev* 67: 36–73, 2015.

**Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, Huang X, Blennerhassett P, Jackson W, Mao Y, Wang L, Rochat F, Collins SM.** Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 55: 182–190, 2006.

**Vergnolle N.** CLINICAL RELEVANCE OF PROTEINASE ACTIVATED RECEPTORS (PARS) IN THE GUT. *Gut* 54: 867–874, 2005.

**Vermeulen W, De Man JG, De Schepper HU, Bult H, Moreels TG, Pelekman PA, De Winter BY.** Role of TRPV1 and TRPA1 in visceral hypersensitivity to colorectal distension during experimental colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 698: 404–412, 2013.

**Vicentini F, Keenan C, Wallace L, Woods C, Cavin J-B, Flockton A, Macklin W, Belkind-Gerson J, Hirota S, Sharkey K.** Intestinal Microbiota Shapes Gut Physiology and Regulates Enteric Neurons and Glia. 2021.

**Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT.** Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. *Science* 328: 228–231, 2010.

**Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, Karamanolis G, Papatheodoridis G, Tzathas C, Gazouli M.** Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE* 11, 2017.

**Vulevic J, Juric A, Walton GE, Claus SP, Tzortzis G, Toward RE, Gibson GR.** Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons. *British Journal of Nutrition* 114: 586–595, 2015.

**Walsh KT, Zemper AE.** The Enteric Nervous System for Epithelial Researchers: Basic Anatomy, Techniques, and Interactions With the Epithelium. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 8: 369–378, 2019.

**Walter SA, Jones MP, Talley NJ, Kjellström L, Nyhlin H, Andreasson AN, Agréus L.** Abdominal pain is associated with anxiety and depression scores in a sample of the general adult population with no signs of organic gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology & Motility* 25: 741-e576, 2013.

**Wang B, Mao Y -k., Diorio C, Wang L, Huizinga JD, Bienenstock J, Kunze W.** Lactobacillus reuteri ingestion and IKCa channel blockade have similar effects on rat colon motility and myenteric neurones. *Neurogastroenterology & Motility* 22: 98-e33, 2010.

**Wang B, Yang A, Zhao Z, He C, Liu Y, Colman RW, Dai J, Wu Y.** The Plasma Kallikrein–Kininogen Pathway Is Critical in the Pathogenesis of Colitis in Mice [Online]. *Frontiers in Immunology* 9, 2018<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00021> [31 Jan. 2022].

**Wen Z, He M, Peng C, Rao Y, Li J, Li Z, Du L, Li Y, Zhou M, Hui O, Feng Y, Yang S.** Metabolomics and 16S rRNA Gene Sequencing Analyses of Changes in the Intestinal Flora and Biomarkers Induced by Gastrodia-Uncaria Treatment in a Rat Model of Chronic Migraine [Online]. *Frontiers in Pharmacology* 10, 2019<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01425> [9 Aug. 2022].

**Weng YJ, Gan HY, Li X, Huang Y, Li ZC, Deng HM, Chen SZ, Zhou Y, Wang LS, Han YP, Tan YF, Song YJ, Du ZM, Liu YY, Wang Y, Qin N, Bai Y, Yang RF, Bi YJ, Zhi FC.** Correlation of diet, microbiota and metabolite networks in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* 20: 447–459, 2019.

**West CL, Stanisz AM, Mao Y-K, Champagne-Jorgensen K, Bienenstock J, Kunze WA.** Microvesicles from Lactobacillus reuteri (DSM-17938) completely reproduce modulation of gut motility by bacteria in mice. *PLOS ONE* 15: e0225481, 2020.

**Westfall S, Pasinetti G.** Design of a Novel Synbiotic Formulation to Optimize Gut-derived Phenolic Acid Mediated Gut-brain Axis Signals for the Treatment of Stress-induced Depression and Anxiety (OR23-03-19). *Current Developments in Nutrition* 3: nzz040.OR23-03-19, 2019.

**van den Wijngaard RM, Klooker TK, Welting O, Stanisor OI, Wouters MM, van der Coelen D, Bulmer DC, Peeters PJ, Aerssens J, de Hoogt R, Lee K, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE.** Essential role for TRPV1 in stress-induced (mast cell-dependent) colonic hypersensitivity in maternally separated rats. *Neurogastroenterol Motil* 21: 1107-e94, 2009.

**Wiles S, Pickard KM, Peng K, MacDonald TT, Frankel G.** In Vivo Bioluminescence Imaging of the Murine Pathogen Citrobacter rodentium. *Infection and Immunity* 74: 5391–5396, 2006.

**Wiskur BJ, Tyler K, Campbell-Dittmeyer K, Chaplan SR, Wickenden AD, Greenwood-Van Meerveld B.** A novel TRPV1 receptor antagonist JNJ-17203212 attenuates colonic hypersensitivity in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 32: 557–564, 2010.

**Wong M-L, Inserra A, Lewis MD, Mastronardi CA, Leong L, Choo J, Kentish S, Xie P, Morrison M, Wesselingh SL, Rogers GB, Licinio J.** Inflammasome signaling affects anxiety- and depressive-like behavior and gut microbiome composition. *Mol Psychiatry* 21: 797–805, 2016.

**Wotherspoon G, Winter J.** Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neuroscience Letters* 294: 175–178, 2000.

**Wouters MM, Balemans D, Van Wanrooy S, Dooley J, Cibert-Goton V, Alpizar YA, Valdez-Morales EE, Nasser Y, Van Veldhoven PP, Vanbrabant W, Van der Merwe S, Mols R, Ghesquière B, Cirillo C, Kortekaas I, Carmeliet P, Peetermans WE, Vermeire S, Rutgeerts P, Augustijns P, Hellings PW, Belmans A, Vanner S, Bulmer DC, Talavera K, Vanden Berghe P, Liston A, Boeckxstaens GE.** Histamine Receptor H1-Mediated Sensitization of TRPV1 Mediates Visceral Hypersensitivity and Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 150: 875-887.e9, 2016.

**Wrzosek L, Miquel S, Noordine M-L, Bouet S, Chevalier-Curt MJ, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M.** Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology* 11: 61, 2013.

**Wu J, Cheng Y, Zhang R, Liu D, Luo Y-M, Chen K-L, Ren S, Zhang J.** P2Y1R is involved in visceral hypersensitivity in rats with experimental irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 23: 6339–6349, 2017.

**Wu RY, Pasyk M, Wang B, Forsythe P, Bienenstock J, Mao Y-K, Sharma P, Stanis AM, Kunze WA.** Spatiotemporal maps reveal regional differences in the effects on gut motility for Lactobacillus reuteri and rhamnosus strains. *Neurogastroenterol Motil* 25: e205-214, 2013.

**Wu T-R, Lin C-S, Chang C-J, Lin T-L, Martel J, Ko Y-F, Ojcius DM, Lu C-C, Young JD, Lai H-C.** Gut commensal Parabacteroides goldsteinii plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from Hirsutella sinensis. *Gut* 68: 248–262, 2019a.

**Wu Y, Wang Y, Wang J, Fan Q, Zhu J, Yang L, Rong W.** TLR4 mediates upregulation and sensitization of TRPV1 in primary afferent neurons in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis. *Mol Pain* 15: 1744806919830018, 2019b.

**Wynn G, Ma B, Ruan HZ, Burnstock G.** Purinergic component of mechanosensory transduction is increased in a rat model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G647-657, 2004.

**Xu G-Y, Shenoy M, Winston JH, Mittal S, Pasricha PJ.** P2X receptor-mediated visceral hyperalgesia in a rat model of chronic visceral hypersensitivity. *Gut* 57: 1230–1237, 2008.

**Xu W, Yuan M, Wu X, Geng H, Chen L, Zhou J, Song Y, Pei L, Sun J.** Electroacupuncture Relieves Visceral Hypersensitivity by Inactivating Protease-Activated Receptor 2 in a Rat

Model of Postinfectious Irritable Bowel Syndrome. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018: 7048584, 2018.

**Xu Z-Z, Kim YH, Bang S, Zhang Y, Berta T, Wang F, Oh SB, Ji R-R.** Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nature Medicine* 21: 1326–1331, 2015.

**Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D.** Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLOS ONE* 4: e6073, 2009.

**Yang J, Li Y, Zuo X, Zhen Y, Yu Y, Gao L.** Transient receptor potential ankyrin-1 participates in visceral hyperalgesia following experimental colitis. *Neurosci Lett* 440: 237–241, 2008.

**YATES FE, RUSSELL SM, DALLMAN MF, HEDGE GA, McCANN SM, DHARIWAL APS.** Potentiation by Vasopressin of Corticotropin Release Induced by Corticotropin-Releasing Factor1. *Endocrinology* 88: 3–15, 1971.

**Ye L, Bae M, Cassilly CD, Jabba SV, Thorpe DW, Martin AM, Lu H-Y, Wang J, Thompson JD, Lickwar CR, Poss KD, Keating DJ, Jordt S-E, Clardy J, Liddle RA, Rawls JF.** Enteroendocrine cells sense bacterial tryptophan catabolites to activate enteric and vagal neuronal pathways. *Cell Host & Microbe* 29: 179-196.e9, 2021.

**Yıldırım S, Shoskes D, Kulkarni S, Laguna P.** Urinary microbiome in uncomplicated and interstitial cystitis: is there any similarity? *World J Urol* 38: 2721–2731, 2020.

**Yousefi B, Eslami M, Ghasemian A, Kokhaei P, Farrokhi AS, Darabi N.** Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of Cellular Physiology* 234: 8008–8018, 2019.

**Yunes RA, Poluektova EU, Dyachkova MS, Klimina KM, Kovtun AS, Averina OV, Orlova VS, Danilenko VN.** GABA production and structure of gadB / gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota. *Anaerobe* 42: 197–204, 2016.

**Zamani M, Alizadeh-Tabari S, Zamani V.** Systematic review with meta-analysis: the prevalence of anxiety and depression in patients with irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 50: 132–143, 2019.

**Zhai R, Xue X, Zhang L, Yang X, Zhao L, Zhang C.** Strain-Specific Anti-inflammatory Properties of Two Akkermansia muciniphila Strains on Chronic Colitis in Mice. *Front Cell Infect Microbiol* 9: 239, 2019.

**Zhang F, Luo W, Shi Y, Fan Z, Ji G.** Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol* 107: 1755; author reply p.1755-1756, 2012.

**Zhang T, Ji X, Lu G, Zhang F.** The potential of Akkermansia muciniphila in inflammatory bowel disease. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2021. doi:10.1007/s00253-021-11453-1.

**Zhao K, Yu L, Wang X, He Y, Lu B.** Clostridium butyricum regulates visceral hypersensitivity of irritable bowel syndrome by inhibiting colonic mucous low grade

inflammation through its action on NLRP6. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 50: 216–223, 2018.

**Zhao Q, Yang W-R, Wang X-H, Li G-Q, Xu L-Q, Cui X, Liu Y, Zuo X-L.** Clostridium butyricum alleviates intestinal low-grade inflammation in TNBS-induced irritable bowel syndrome in mice by regulating functional status of lamina propria dendritic cells. *World J Gastroenterol* 25: 5469–5482, 2019.

**Zheng D, Liwinski T, Elinav E.** Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 30: 492–506, 2020.

**Zhou D, Pan Q, Xin F-Z, Zhang R-N, He C-X, Chen G-Y, Liu C, Chen Y-W, Fan J-G.** Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World J Gastroenterol* 23: 60–75, 2017.

**Zhou J, Zhou Z, Ji P, Ma M, Guo J, Jiang S.** Effect of fecal microbiota transplantation on experimental colitis in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine* 17: 2581–2586, 2019.

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

**Zhu C, Song K, Shen Z, Quan Y, Tan B, Luo W, Wu S, Tang K, Yang Z, Wang X.** Roseburia intestinalis inhibits interleukin-17 excretion and promotes regulatory T cells differentiation in colitis. *Molecular Medicine Reports* 17: 7567–7574, 2018.

**Zielińska A.** 11 - Pain in irritable bowel syndrome. In: *A Comprehensive Overview of Irritable Bowel Syndrome*, edited by Fichna J. Academic Press, p. 145–166.

**Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W.** Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* 12: 2189, 2020.





## Résumé

Les douleurs abdominales chroniques, un symptôme partagé par de nombreux patients atteints de pathologies gastro-intestinales comme le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII) ou les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), représentent un motif de consultation récurrent en gastroentérologie et pour lesquels les traitements sont limités et souvent peu efficaces. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques constitue une priorité. Le microbiote intestinal tient une place centrale puisque les progrès en matière de séquençage ont permis de révéler une altération de sa composition chez ces patients. Alors que certaines espèces bactériennes prolifèrent, d'autres au contraire voient leur population s'effondrer et leur rôle dans la santé de l'hôte est aujourd'hui fortement envisagé. En plus de restaurer la barrière épithéliale intestinale et de moduler la réponse inflammatoire, certaines bactéries bénéfiques participent activement au dialogue « microbiote-intestin-cerveau » et pourraient, en interagissant directement avec le système nerveux, moduler le processus douloureux. Ainsi, le potentiel thérapeutique du microbiote intestinal ouvre le champ à une nouvelle classe de médicaments : les probiotiques de nouvelle génération.

Mes travaux de thèse avaient pour objectif de révéler le potentiel neuromodulateur du microbiote intestinal et de sélectionner un candidat bactérien capable de réduire l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) dans plusieurs modèles murins de douleur viscérale. L'établissement d'une collection de souches anaérobies et la mise au point d'une méthode de screening à haut débit a permis, d'une part, de révéler les propriétés neuromodulatrices de souches bactériennes mais aussi de sélectionner la souche *Parabacteroides distasonis* F1-2 pour ses propriétés neuro-inhibitrices sur des cellules neuronales immortalisées mais aussi sur des cultures primaires de neurones issus de DRG de rat.

Le second objectif de ma thèse a été de déterminer si l'effet neuro-inhibiteur de la souche F1-2 pouvait se traduire par un effet anti-hyperalgique chez la souris. La souche F1-2, testée dans plusieurs modèles de douleur viscérale, exerce un effet anti-hyperalgique remarquable en réduisant l'HSVC lorsque l'intégrité de la barrière intestinale est compromise. Cependant, et contrairement à la plupart des souches probiotiques déjà connues, la souche F1-2 ne présenterait pas de propriétés anti-inflammatoires ni de renforcement de la barrière épithéliale intestinale. Ces travaux constituent la première preuve d'un potentiel effet antalgique de *P. distasonis* et les premiers résultats obtenus quant à son innocuité sont des données fortement encourageantes et permettent d'envisager son utilisation chez l'Homme.

L'hypothèse d'une interaction directe entre la souche F1-2 et les cellules neuronales est aujourd'hui suggérée et l'exploration des mécanismes d'interaction a permis de caractériser l'effet neuro-inhibiteur de la souche F1-2 sous diverses stimulations nociceptives. La possible implication de la bradykinine et/ou de ses récepteurs ouvre une nouvelle voie d'investigation dans la compréhension du dialogue établi entre bactéries et neurones.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre au point une méthode visant à sélectionner des souches bactériennes aux propriétés neuromodulatrices et de révéler le potentiel thérapeutique de la souche bactérienne *P. distasonis* F1-2 chez la souris. Il est aujourd'hui possible d'envisager son utilisation chez l'Homme en tant que probiotique de nouvelle génération destiné à soulager les patients souffrant de douleurs abdominales chroniques.