THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Camille PETITFILS

Le 15 décembre 2021

Identification et caractérisation de métabolites lipidiques bactériens impliqués dans l'homéostasie intestinale

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :
IRSD - Institut de Recherche en Santé Digestive

Thèse dirigée par
Nicolas CENAC et Pauline LEFAOUDER

Jury

M. Nicolas BARNICH, Rapporteur
Mme Muriel DARNAUDERY, Rapporteure
M. Bruno GUIARD, Président du jury
Mme Rebeca MARTIN-ROSIQUE, Examinatrice
M. Nicolas CENAC, Directeur de thèse
Mme Pauline LE FAOUDER, Co-directrice de thèse

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mes travaux de thèse. Merci aux Professeur.e.s Nicolas Barnich et Muriel Darnaudéry d'en avoir été les rapporteur.e.s, au Professeur Bruno Guiard et à la Docteure Rebeca Martin-Rosique d'en avoir été l'examinateur et l'examinatrice.

Je voudrais ensuite remercier Nicolas pour ces 5 années d'encadrement. Merci de m'avoir laissé une chance en M1, puis en M2, puis en thèse, et de m'avoir donné les moyens de progresser et de grandir scientifiquement. Ce fut un plaisir de tant apprendre à vos côtés. Merci pour votre patience à toute épreuve.

Je voudrais également remercier Pauline de m'avoir co-encadré, même si je n'ai pas passé autant de temps à la plateforme que ce qui était prévu, ça a toujours été un plaisir de venir faire un peu de spectro ! Merci d'avoir su être présente dans les moments moins faciles.

Gilles, merci pour votre disponibilité, vos conseils et vos idées. Ce fut un plaisir de vous avoir comme chef d'équipe pendant toutes ces années.

Cathy, comme tous les étudiants précédents je vais te remercier pour ta patience, ta gentillesse, et ton aide toujours si précieuse ! Merci d'être là pour nous !

Merci à Gaëlle pour ton aide si précieuse, au labo et en dehors, pour ton organisation, et ta bonne humeur. Ce fût un plaisir de travailler avec toi, de partager ces 2 années, et de traverser les longues journées à la zootechnie avec toi ! Merci pour ton soutien quotidien.

Julien, je voudrais te remercier de m'avoir encadré en manip pendant mon master 1 et mon master 2 et de m'avoir appris tant de chose ! Merci de m'avoir accompagné avec bienveillance et gentillesse. On a chacun parcouru un sacré chemin depuis 2017 !

Amandine, merci pour ton professionnalisme, ton organisation et ton aide. J'ai apprécié faire ma thèse en parallèle de la tienne. J'ai hâte de voir tout ce que tu vas accomplir en post-doc !

Marie A, Marie G, Mathilde et Nadine, merci pour votre soutien et votre amitié. On aurait difficilement pu faire mieux comme copines pour vivre cette aventure !

Merci à ma famille de m'avoir soutenue pendant toutes ces années.

Gabriel, merci d'être là et de ton soutien sans faille.

Résumé

Par sa contribution à l'ensemble des grandes fonctions de l'organisme, le microbiote intestinal possède un rôle essentiel dans la physiologie et la pathologie de son hôte. Un microbiote est caractérisé par son répertoire de gènes exprimés et, plus important encore, par les métabolites qu'il sécrète. De nombreuses études ont déterminé la composition taxonomique du microbiote, mais peu en ont caractérisé les gènes actifs, les protéines ou les métabolites, ce qui pourrait être plus pertinent. En effet, la composition taxonomique du microbiote humain varie énormément d'un individu à l'autre, tandis que sa composition génétique ou sa capacité fonctionnelle est très conservée. La capacité fonctionnelle du microbiote est redondante et capitale pour maintenir sa stabilité et sa résilience. A la notion de redondance fonctionnelle est associée l'idée que, jusqu'à un certain point, les espèces sont substituables d'un microbiote à l'autre en termes de fonctionnalité. Il est donc majeur d'identifier les métabolites du microbiote intestinal et de déterminer leur effet sur l'hôte. Les travaux présentés dans cette thèse sont focalisés sur la caractérisation de métabolites lipidiques produits par les bactéries intestinales afin d'étudier les interactions entre le microbiote intestinal et son hôte.

Pour notre premier projet, nous nous sommes intéressés à une souche d'*Escherichia coli*, *E. coli* Nissle 1917 (EcN), indiquée comme probiotique dans les phases de rémission de la rectocolite hémorragique. Nous avons quantifié une augmentation de la concentration d'un acide gras β-hydroxylé, le C18-3OH, produit par EcN par rapport à des *E. coli* commensales ou pathogènes. Nous avons donc testé les propriétés anti-inflammatoires de ce lipide dans un modèle murin de colite induit par le DSS. Le C18-3OH diminuait la sévérité de l'inflammation en se liant au récepteur nucléaire PPARγ. L'utilisation d'un prébiotique (fructo-oligosaccharide) ayant une activité anti-inflammatoire, nous a permis de démontrer qu'une autre bactérie du microbiote intestinal, *Holdemanella biformis*, était également capable de produire de grande quantité de C18-3OH.

Le microbiote joue un rôle critique dans la maturation et le développement, notamment intestinal, de son hôte. Par exemple, chez la souris, une modification du microbiote, ou dysbiose, induite par des antibiotiques lors du sevrage augmente l'intensité de l'inflammation dans un modèle de colite. Le microbiote étant extrêmement sensible à son environnement, le stress, qu'il soit subit en prénatal, post natal ou à l'âge adulte, modifie sa composition. Néanmoins, le lien de

causalité entre le stress prénatal, la dysbiose du microbiote intestinal et les troubles fonctionnels digestifs n'a jamais été établi. Dans un modèle murin de stress prénatal (SP), nous avons montré que la descendance adulte mâle et femelle développait une hypersensibilité viscérale associée à une dysbiose du microbiote intestinal et une absence d'inflammation macroscopique, trois caractéristiques du syndrome de l'intestin irritable. Comme l'abondance de *Ligilactobacillus murinus/animalis* était inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale, nous avons étudié les lipides produits par cette bactérie et identifié un lipopeptide, le C14AsnGABA. L'administration intra-colique de cette molécule restaurait une normo-sensibilité viscérale chez les souris SP.

Ces deux projets nous ont permis d'identifier des lipides ayant des propriétés anti-inflammatoires ou analgésiques produits par des bactéries présentes dans le microbiote intestinal. Ces molécules pourraient jouer un rôle dans l'interaction entre le microbiote et son hôte.

Abstract

By contributing to all of the major functions of the body, the gut microbiota has an essential role in the host physiopathology. Microbiotas are characterised by their expressed genes repertoire, and even more importantly, by the metabolites they secrete. Numerous studies have analysed the taxonomic composition of the gut microbiota, but few have characterized its active genes or its secreted metabolites, which could be more relevant to understand the interplay between the host and the gut bacterial communities. Indeed, the taxonomic composition of the human microbiota varies between individuals, while its genetic combination and its functional capacity are highly conserved. The gut microbiota's functional capacity is redundant and necessary to maintain its stability and resilience. This is associated with the idea that, until a certain point, species can be substituted in terms of functionality. Therefore, it is important to identify microbial metabolites and to determine their effect on the host. The work presented in this manuscript is focused on characterising lipidic metabolites produced by the gut microbiota and their importance in host-microbiota interactions.

For our first project, we were interested in *Escherichia coli Nissle 1917 (ECN*) used to lengthen the remission phases of ulcerative colitis patients. We quantified an increased concentration of a β-hydroxy fatty acid, the C18-3OH in ECN compared to commensal or pathogenic *E. coli*. We tested the anti-inflammatory properties of this fatty acid in a murine model of DSS-induced colitis. C18-3OH decreased inflammation severity by the activation of the nuclear receptor PPARγ. By using a prebiotic (fructooligosaccharide) that has anti-inflammatory properties, we demonstrated that another bacterium from the gut microbiota, *Holdemanella biformis*, produces large amounts of C18-3OH.

The gut microbiota plays a crucial role in host development. For example, in mice, gut microbiota alterations, called dysbiosis, induced by antibiotics at weaning increases inflammation intensity in a colitis model. The microbiota is very sensitive to its environment, and stress, either pre or post-natal, or in adulthood, alters its composition. However, the causal link between prenatal stress, dysbiosis and functional gastrointestinal disorders has not been established. In a murine model of prenatal stress, we showed that the male and female adult offspring developed visceral hypersensitivity associated with gut microbiota dysbiosis and no macroscopic inflammation, three characteristics of irritable bowel syndrome. As the abundance

of *Ligilactobacillus murinus/animalis* was inversely correlated to visceral hypersensitivity, we studied the lipids produced by this bacterium and identified a lipopeptide, the C14asnGABA. The intra-colonic administration of C14AsnGABA restored normo-sensitivity in PS mice.

These two projects lead to the identification of two lipids, that have anti-inflammatory or analgesic properties, produced by bacteria of the gut microbiota. These molecules could play a role in the host-gut microbiota interactions.

Table des matières

Liste des abréviations....p1

Table des illustrations....p6

Introduction....p10

Chapitre 1 : l'intestin....p11

I. Anatomie....p11

A. Le système digestif : généralités....p11

B. La paroi intestinale....p13

C. Le développement de l'intestin....p14

II. Les cellules épithéliales intestinales....p15

A. Les cellules non différenciées....p16

B. Le lignage absorbant....p16

1. Les colonocytes....p16

2. Les cellules BEST4-OTOP2....p16

3. Les cellules M....p16

C. Le lignage sécrétoire....p17

D. Les cellules caliciformes....p17

1. Les cellules entéro-endocrines....p17

2. Les tufts cells....p18

III. Les récepteurs et transporteurs des lipides présents dans les cellules épithéliales du côlon....p18

A. Le flip-flop lipidique....p19

B. Les transporteurs....p20

C. Les récepteurs membranaires....p20

1. Les récepteurs des acides gras à courte chaîne....p20

2. Les récepteurs des acides gras à longue et moyenne chaîne……p21
D. Les récepteurs nucléaires PPAR……p22

IV. La fonction de barrière……p24
A. Généralités……p24
B. Une barrière physique……p25
1. Les interactions cellule/cellule……p25
a) Les jonctions serrées……p25
b) Les jonctions adhérentes……p26
c) Les desmosomes……p27
2. Les interactions cellule/matrice……p27
3. Le mucus……p28
C. Une barrière chimique……p29
D. Une barrière immunologique……p30
1. L'épithélium intestinal……p30
2. Les structures immunologiques de l'intestin……p32
E. Une barrière microbienne……p32
F. L'altération de la barrière……p32

V. L'innervation intestinale……p34
A. Généralités ……p34
B. Le système nerveux entérique intrinsèque……p34
C. Le système nerveux entérique extrinsèque……p35
1. L'innervation extrinsèque afférente……p36
2. L'innervation extrinsèque efférente……p37
a) L'innervation orthosympathique……p37
b) L'innervation parasympathique……p37

VI. La douleur viscérale.....p38
A. Définition.....p38
B. Généralités.....p39
C. Les voies afférentes de la douleur viscérale ou nocicepteurs.....p40
1. Les populations mixtes.....p41
2. Les populations lombo-sacrées.....p42
D. Les récepteurs majeurs de la douleur viscérale.....p43
1. Les récepteurs canaux.....p44
a) TRPV1 (Transient Receptor Petential Vanilloid 1).....p44
b) TRPV4 (Transient Receptor Petential Vanilloid 4).....p45
c) TRPA1 (Transient Receptor Petential Ankyrin 1) p45
d) TRPM8 (Transient Receptor Petential Melastatin 8).....p45
2. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).....p46
a) Les récepteurs à la bradykinine.....p46
b) Les récepteurs à l'histamine.....p47
c) Les récepteurs à la sérotonine.....p47
d) Les récepteurs au GABA.....p47

Chapitre 2 : le microbiote intestinal.....p49

I. Généralités.....p49
A. Généralités & définitions.....p49
B. Composition, organisation et fonctions du microbiote.....p50

II. La mise en place du microbiote intestinal.....p54
A. La primo-colonisation.....p55
B. L'allaitement.....p56
C. Le sevrage.....p58
D. La période post-sevrage.....p58

III. Les modulations du microbiote intestinal……p59

A. Les prébiotiques……p59

B. Les probiotiques……p61

C. *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)……p62

1. *Holdemanella biformis*……p64

2. *Ligilactobacillus murinus/animalis*……p66

Chapitre 3 : les métabolites sécrétés par le microbiote intestinal……p69

I. La redondance fonctionnelle du microbiote intestinal……p69

II. Les métabolites du microbiote intestinal……p70

A. Généralités & historique……p70

B. Les métabolites non lipidiques……p71

1. Les vitamines……p71

2. Les métabolites des acides aminés……p72

a) L'histamine……p72

b) Les indoles……p72

c) Le sulfure d'hydrogène……p72

d) Le glutamate et le GABA……p73

e) Les autres métabolites non lipidiques du microbiote intestinal……p75

C. Les métabolites lipidiques……p76

1. Les lipides à courte et moyenne chaînes et leurs dérivés……p76

a) Généralités……p76

b) L'acétate……p78

c) Le propionate……p78

d) Le butyrate……p79

2. Les lipides complexes……p80

a) Les acides biliaires secondaires……p80

b) Les dérivés des acides gras polyinsaturés……p83

c) Le lipide A……p84

d) Les acides gras β-hydroxylés……p85
e) Les lipopeptides et aminolipides……..p87
- Les commendamides et les N-acyl amides ou aminolipides…..p87
- Les lipopeptides……p88

Chapitre 4 : L'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau et impact du stress chronique……p93

I. L'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau……p93
A. Historique & généralités……p93
B. Mécanismes impliqués……p94

II. Le stress chronique……p96
A. Historique……p96
B. Généralités & définitions……p97
C. Les axes du stress……p97
1. L'axe hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HHS)……p97
a) Description……p97
b) Les hormones de l'axe HHS……p98
c) Les différences homme/femme……p100
d) Développement……p100
2. Le système nerveux sympathique (SNS)……p101

III. Le stress chronique et le tractus digestif……p102
A. L'âge adulte……p102
B. Les 1000 premiers jours de vie……p104
1. La période néonatale……p104
2. La période prénatale……p107
3. Les différences mâle/femelle……p110

Résultats.....p112

Objectifs des travaux de thèse.....p113

Article 1 : Propriétés anti-inflammatoire d'un acide gras à longue chaîne bactérien dans la colite.....p115

Article 2 : Douleur viscérale induite par le stress prénatal : rôle des lipopeptides bactériens.....p160

Discussion & perspectives.....p204

Annexes.....p219

Annexe 1 : Curriculum vitae.....p222

Annexe 2 : Publications issues de travaux collaboratifs.....p226

House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation.....p226

Analgesic effects of topical amitriptyline in patients with chemotherapy- induced peripheral neuropathy: mechanistic insights from studies in mice.....p251

Peripheral opioid receptor blockade enhances epithelial damage in piroxicam-accelerated colitis in IL-10-deficient mice.....p265

Références bibliographiques.....p278

Liste des abréviations

10-HODE = acide 10-Hydroxyoctadecadienoïque

10-TriHOME = acide 10-trihydroxyoctadecanoïque

11,12-EET = Acide 11,12-epoxy-eicosatrienoïque

11β-HSD2 = 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2

12,13-DiHOME = acide 12,13-hydroxyoctadecadienoiques

12-TriHOME = acide 12-trihydroxyoctadecanoique

14,15-EET = Acide 14,15-epoxy-eicosatrienoïque

15dPGJ2 = 15-deoxy-delta 12,14-Prostaglandine J2

15-HETE = Acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque

5,6-EET = Acide 5,6-epoxy-eicosatrienoïque

5-ASA = 5-Aminosalicylic Acid

5-HETE = Acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque

5-HT = 5-Hydroxytryptamine

5-oxoETE = Acide 5-Oxo-eicosatetraenoïque

6kPGF1α = 6-kéto-prostaglandine F1α

8,9-EET = Acide 8,9-epoxy-eicosatrienoïque

8-HETE = Acide 8-hydroxyeicosatétraénoïque

8isoPGA2 = 8-iso Prostaglandine A2

9,10-DiHOME = acide 9,10-hydroxyoctadecadienoique

AAFAH = Acyl Alpha-Hydroxyl Fatty Acid

AB = Acide Biliaire

AC = Adénylate Cyclase

ACP = Analyse par Composante Principale

ACTH = Adenocorticotrope Hormone

AG =Acide Gra

AGCC = Acides Gras à Courte Chaîne

AGLC = Acides Gras à Longue Chaîne

AhR = Aryl hydrocarbon Receptor

AITC = Allyl Isothiocyanate

AMPc = Adénosine Monophosphate Cyclique

AUC = Area under the curve / aire sous la courbe

BEST4 = Bestrophin-4

BK = Bradykinine

BSH = Bile Salt Hydrolase

C18-3OH = acide 3-hydroxyoctadecaenoïque

CA = Acide Cholique

CBC = Crypt Base Columnar

Cbln2 = Cerebellin 2 precursor protein

CD36 = Cluster of Differenciation 36

CDCA = Acide Chenodésoxycholique

CEI = Cellules Epithéliales Intestinales

CGS = Chaîne de Ganglion Sympathique

CLA = Acide linoléique conjugué

CORT = Cortisol/Corticostérone

CP = Crypto Plaque

CRF = corticotropin-releasing factor receptor

CRH = Corticotropin-Realeasing Hormone

CSE = Cystathionine γ-lyase

DAG = Diacyl Glycerol

DCA = Acide Désoxycholique

DSS = Dextran Sulfate Sodium

EcN = *Escherichia coli Nissle 1917*

Fam19a1 = Family with sequence similarity 19, member A1

FAT = Fatty Acid Translocase

FATP4 = Fatty Acid Transport Protein

FFAR = Free Fatty Acid Receptor

FOS = Fructo-oligosaccharides

FXR = Farnesoid X Receptor

GABA = Gamma Amino Butyrique Acid

GALT = Gut-Associated Lymphoid Tissues

GCs = glucocorticoides

GLP-1 = Glucagon Protein Like 1

GLP-2 = Glucagon Protein Like 2

GP = Ganglion Pelvien

GP2 = Glycoprotein de surface 2

GR = glucocorticoid receptor

GSD = Ganglions Spinaux Dorsaux

HCAR2 = Hydrocarboxylique Acid Receptor 2

HDAC = Histone Déacétylase

HHS = Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien

HMO = Human Milk Oligosaccharides

Hpse = Heparanase

HSV = Hyper sensibilité viscérale

HYA = Acide 10-hydroxy-cis-12-octadecenoïque

HYB = Acide 10-hydroxy-octadecanoïque

HYC = Acide 10-hydroxy-trans-11-octadecenoïque

I-FABP = Intestine Fatty Acid Binding Protein

IFAN = IntestinoFugal Neurons

IgA = Immunoglobuline A

IgM = Immunoglobuline M

IL = Interleukine

ILC = Innate Lymphoid Cells

ILF = Follicules Lymphoid Isolés

IP3 = Inositol triphosphate

IPAN = Intrinsic Primary Afferent Neuron

JAM = Junctional Adhesion Molecule

KetoA = Acide 10-oxo-cis-12-octadecenoïque

KetoB = Acide 10-oxo-octadecanoïque

KetoC = Acide 10-oxo-trans-11-octadecenoïque

LCA = Acide Lithocholique

Ldbh = Lactate déhydrogenase B

L-FABP = Liver Fatty Acid Binding Protein

LPS = Lipopolysaccharide

LS = Lombo-Sacré

LTB4 = Leukotriene B4

LXA_4 = Lipoxine A4

MC2R = Melanocortin 2 receptor

MCT1 = Monocarboxylate Transporter Isoform 1

MEC = Matrice Extra-Cellulaire

MICI = Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

mLN = Noeud Lymphatiques mésentériques

mNFa = mixte NeuroFilament a

mNFb = mixte NeuroFilament b

mNP = mixte Non Peptidergique

mPEPa = mixte Peptidergique a

mPEPb = mixte Peptidergique b

MR = mineralocorticoid receptor

Mrgprd = MAS-related GPR member D

MUC2 = Mucin 2

MYD88 = Myeloid Differenciation primary response gene 88

MyD88 = Myeloid Differentiation primary response gene 88

Nefh = Neurofilament heavy chain

NFκB = Nuclear Factor-kappa B

NLR = Nod-Like Receptor

NPV = Noyau ParaVentriculaire

NRPS = Non-Ribosomale Peptide Synthases

Ntm = Neurotrimine

OPLS-DA = Orthogonal partial least squares-discriminant analysis

OTOP-2 = Otopetrin 2

P2rx3 = Purinergic receptor P2X3

PAM = Peptides Anti-Microbiens

PAMP = Pathogenes Associated Molecular Pattern

PGD2 = Prostaglandine D2

PGE_2 = Prostaglandine E2

PKC = Protein Kinase C

PKS =Polyketide Synthases

PLS-DA = Partial least squares-discriminant analysis

pNF = pelvic NeuroFilament

PP = Plaque de Peyer

PPAR = Peroxysome Proliferator Activated Receptor

pPEP = pelvic Peptidergic

PPRE = Peroxysome Proliferator Response Elements

PRR = Pattern Recognition Receptors

PYY = Peptide Tyrosine Tyrosine

RCH = Rectocolite hémorragique

RCPG = Récepteurs Couplés à des Protéines G

RE = Reticulum Endoplasmique

RegIIIγ = Regenerating islet-derived protein 3 gamma

RELM = Resistin Like Molecules

RLR = Rig-Like Receptor

RVD_1 = Résolvine D1

RVD_2 = Résolvine D2

RVE_1 = Résolvine E1

RVM = Réponses viscéro-mortices

RXR = Retinoid X Receptor

SCMT = Sodium-Coupled Monocarboxylate Transporter

SFAHFA = Short-chain Facid esters of Hydroxy Fatty Acids

SII = Syndrome de l'Intestin Irritable

Smr2 = Submaxillary gland androgen regulated protein 2

SNC = System Nerveux Central

SNE = System Nerveux Entérique

TA = Transit Amplifying

TD= Tractus Digestif

TFF = TreFoild Factor

Th = Tyrosine hydroxylase

TJ = Tight Junction

TL = Thoraco-Lombaire

TLR = Toll Like Receptor

TMAO = Triméthylamin-N-Oxide

TNBS = Trinitrobenzène Sulfonic Acid

TR-FRET = Time-resolved fluorescence energy transfer

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

TRPA Transient Receptor Potential Ankyrin

TRPM8 = Transient Receptor Potential Melastatin 8

TRPV = Transient Receptor Potential Vanilloid

TXB_2 = Thromboxane B2

UDCA = Acide Urodésoxycholique

ZO = Zona Occludens

Table des illustrations

Chapitre 1 : L'intestin

Figure 1 : Anatomie du tractus digestif *p11*

Figure 2 : Structure de l'intestin grêle et du côlon *p12*

Figure 3 : Structure de la paroi du côlon *p14*

Figure 4 : Le développement de l'intestin *p15*

Figure 5 : Les cellules épithéliales du côlon *p18*

Figure 6 : Les récepteurs et transporteurs des lipides dans les CEI *p19*

Figure 7 : Les récepteurs des acides gras à courte chaîne *p21*

Figure 8 : Les récepteurs des acides gras à moyenne et longue chaîne *p22*

Figure 9 : L'activation des récepteurs nucléaires PPAR *p24*

Figure 10 : Les jonctions serrées *p25*

Figure 11 : Les jonctions adhérentes *p26*

Figure 12 : Les desmosomes *p27*

Figure 13 : Les interactions cellule/matrice *p28*

Figure 14 : La fonction de barrière *p29*

Figure 15 : La voie NFκB est régulée par PPARα et PPARγ *p31*

Figure 16 : Le système nerveux entérique intrinsèque *p35*

Figure 17 : Le système nerveux entérique extrinsèque *p38*

Figure 18 : Heatmap des 100 gènes les plus exprimés dans les sept sous-populations en séquençage ARN single cell *p41*

Figure 19 : Les cinq populations mixtes d'afférences sensitives du côlon *p42*

Figure 20 : Les deux populations exclusivement pelviennes des afférences sensitives du côlon *P43*

Figure 21 : Les récepteurs impliqués dans la douleur viscérale *p44*

Figure 22 : Les canaux calciques *p46*

Figure 23 : Les récepteurs couplés à des protéines G *p48*

Chapitre 2 : Le microbiote intestinal

Figure 24 : Représentation des animalcules par A. van Leeuwenhoek *p49*

Figure 25 : Les phyla composant le microbiote intestinal *p50*

Figure 26 : Le gradient longitudinal *p51*

Figure 27 : Composition des microbiotes murin et humain *p52*

Figure 28 : Les fonctions du microbiote *p54*

Figure 29 : La mise en place du microbiote intestinal *p56*

Figure 30 : La fermentation du FOS *p61*

Figure 31 : Arbre phylogénétique d'Escherichia coli *p64*

Figure 32 : Effets probiotiques d'Escherichia coli Nissle 1917 *p64*

Figure 33 : Arbre phylogénétique d'Holdemanella biformis *p65*

Figure 34 : Effets probiotiques d'Holdemanella biformis *p65*

Figure 35 : Arbre phylogénétique de Ligilactobacillus murinus/animalis *p67*

Figure 36 : Effets probiotiques de Ligilactobacillus murinus/animalis *p68*

Chapitre 3 : Les métabolites sécrétés par le microbiote intestinal

Figure 37 : La redondance fonctionnelle du microbiote du tractus digestif *p70*

Figure 38 : Les métabolites sécrétés du microbiote intestinal *p71*

Figure 39 : Synthèse du glutamate et du GABA *p74*

Figure 40 : Effets des métabolites non lipidiques du microbiote intestinal *p75*

Figure 41 : Structure des acides gras à courte et moyenne chaîne *p77*

Figure 42 : Synthèse des acides gras à courte chaîne *p78*

Figure 43 : Effets des acides gras à courte chaîne *p80*

Figure 44 : Structure des acides biliaires primaires et secondaires *p81*

Figure 45 : Production des acides biliaires secondaires *p82*

Figure 46 : Structure et formation des dérivés des acides linoléique et oléique *p83*

Figure 47 : Structure du lipide A et du LPS *p85*

Figure 48 : Structure des acides gras ß-hydroxylés, exemple du C18-3OH *p85*

Figure 49 : Biosynthèse des acides gras ß-hydroxylés *p86*

Figure 50 : Effets des acides biliaires secondaires, des dérivés de l'acide linoleique *p87*

Figure 51 : Structure des commendamides et des aminolipides, exemples du palmytoyl tryptamine et du C12asnOH *p87*

Figure 52 : Structure des lipopeptides, exemples de la surfactine et du C12asnGABA *p89*

Figure 53 : Effets des lipopeptides *p90*

Figure 54 : Structure de l'îlot pks *p91*

Figure 55 : Structure des SFAHFAs et des AAFAHs *p92*

Chapitre 4 : L'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau et impact du stress chronique

Figure 56 : L'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau *p96*

Figure 57 : L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien *p98*

Figure 58 : Les hormones de l'axe HHS *p99*

Figure 59 : Variations de l'axe HHS pendant la grossesse *p101*

Figure 60 : L'axe du système nerveux sympathique *p102*

Figure 61 : Les hormones de l'axe du SNS *p102*

Figure 62 : Impact du stress chronique à l'âge adulte *p104*

Figure 63 : Impact du stress chronique pendant la période néonatale *p106*

Figure 64 : Impact du stress chronique pendant la période prénatale *p108*

Figure 65 : Mécanismes potentiellement impliqués dans l'impact du stress prénatal *p110*

Résultats

Figure 66 : Schéma bilan du premier article *p120*

Figure 67 : Schéma bilan du second article *p167*

Discussion & Perspectives

Figure 68 : Chromatogramme des AG libres d'EcN *p205*

Figure 69 : Quantification de la production de C18-3OH dans différentes bactéries *p209*

Figure 70 : Variations du microbiote vaginal humain *p213*

Figure 71 : Quantification de Lactobacillus dans les vagins de mères stressées *p214*

Figure 72 : Quantification de L. murinus dans les fèces des souriceaux *p214*

Figure 73 : Plan expérimental de Jašarević et al. 2018 *p215*

Figure 74 : Quantification de L. murinus dans les côlons de souriceaux *p217*

Introduction

Chapitre 1 : L'intestin

I. Anatomie

A. Le système digestif : généralités

Le système digestif est formé de plusieurs organes constituants le tractus digestif et les glandes accessoires. Le tractus digestif, long d'environ 8 mètres chez l'humain, est organisé en différents segments qui représentent la plus grande surface de contact du corps avec l'environnement extérieur. Il contient, de haut en bas, la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Les glandes annexes, les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas, l'assistent dans sa fonction principale : la digestion des aliments ***(Figure 1).***

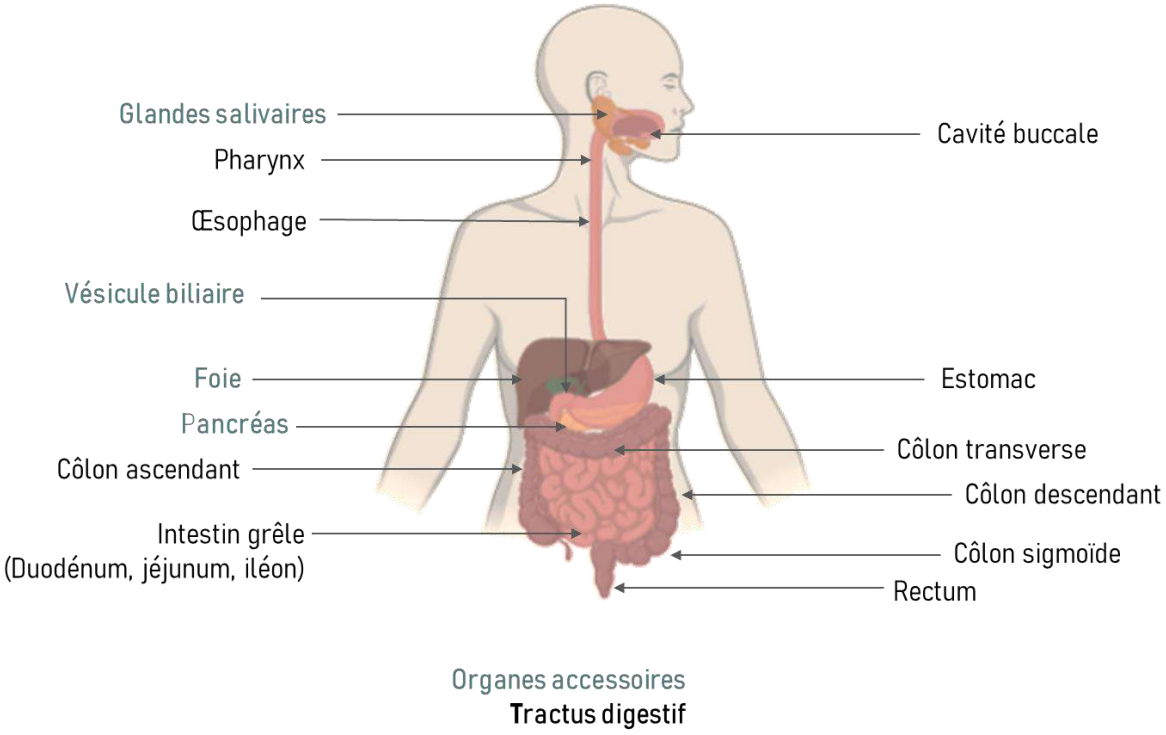


Figure 1 : Anatomie du tractus digestif

Divisé en deux parties fonctionnellement distinctes chez les mammifères, l'intestin grêle et le côlon, le tractus digestif (TD) mesure environ 6 mètres de long chez l'humain ce qui en fait la partie la plus longue du tractus digestif. Sa surface importante, a longtemps été mesurée sur des tissus morts, ce qui en donnait une estimation erronée de 260 à 400m². De récentes études, menées avec des techniques radiographiques, ont montré qu'il possède en réalité une surface d'environ 30 à 40 m² chez l'humain et de 1,4m² chez la souris [1]. L'intestin grêle, composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, est responsable de la majorité de la digestion et de l'absorption des aliments. Cette fonction est optimisée par sa grande surface, repliée en replis muqueux, puis en cryptes et villosités, et enfin en microvillosités [2] ***(Figure 2).***

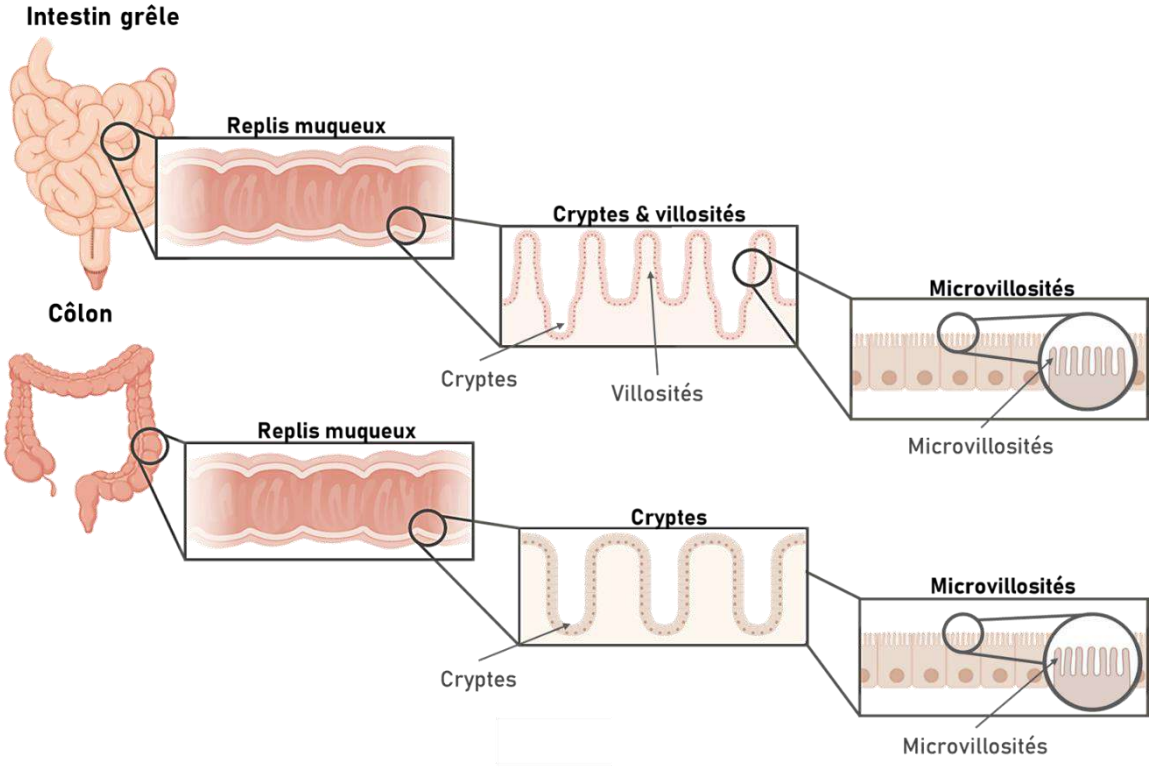


Figure 2 : Structure de l'intestin grêle et du côlon

Le gros intestin est la dernière partie du tractus digestif. Il est formé par le caecum, le côlon, le rectum et le canal anal. Le côlon est lui-même divisé en 4 segments, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde. Il a pour rôle d'absorber l'eau et les électrolytes, et d'éliminer les déchets de la digestion. Comme l'intestin grêle, il comporte plusieurs replis afin d'augmenter la surface d'échange entre l'environnement extérieur et

l'intestin. Cependant, le côlon ne comporte pas de villosités, seulement des cryptes et des microvillosités [2] ***(Figure 2).***

B. La paroi intestinale

La paroi de l'ensemble des segments du tractus possède la même organisation en 4 tuniques concentriques : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse externe et la séreuse ou adventice. Dans ce paragraphe, seule l'organisation du colon sera présentée. **(*Figure 3)***. La muqueuse borde l'intégralité du côlon et est elle-même constituée de trois couches différentes. De la lumière vers la séreuse se trouve : un épithélium différencié et polarisé, la lamina propria, et la muscularis mucosae. L'épithélium du côlon est prismatique et unistratifié. La lamina propria est composée de tissu conjonctif, et fournit le support vasculaire nécessaire à l'épithélium muqueux sous-jacent. Contenant de nombreux lymphocytes, plasmocytes, nœuds et vaisseaux lymphatiques, elle constitue un tissu immunitaire important. La muscularis mucosae est, elle, constituée de muscles lisses qui participent aux mouvements de la muqueuse et des cellules interstitielles de Cajal qui sont le « pacemaker » de la motilité intestinale [2]**.** La sous-muqueuse est un fin tissu conjonctif qui a un rôle de support de la muqueuse. Elle contient le plexus sous-muqueux, ou plexus de Meissner, un réseau neuronal contrôlant les muscles lisses de la muscularis mucosae [2]. La musculeuse est représentée par deux couches musculaires : une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Elle renferme le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach qui rythme le péristaltisme (onde rythmique de contraction) permettant le déplacement des aliments le long de l'intestin [2]. La séreuse est la couche de tissu conjonctif la plus externe de la paroi intestinale. Elle prend le nom d'adventice lorsqu'elle est attachée aux tissus environnants [2].

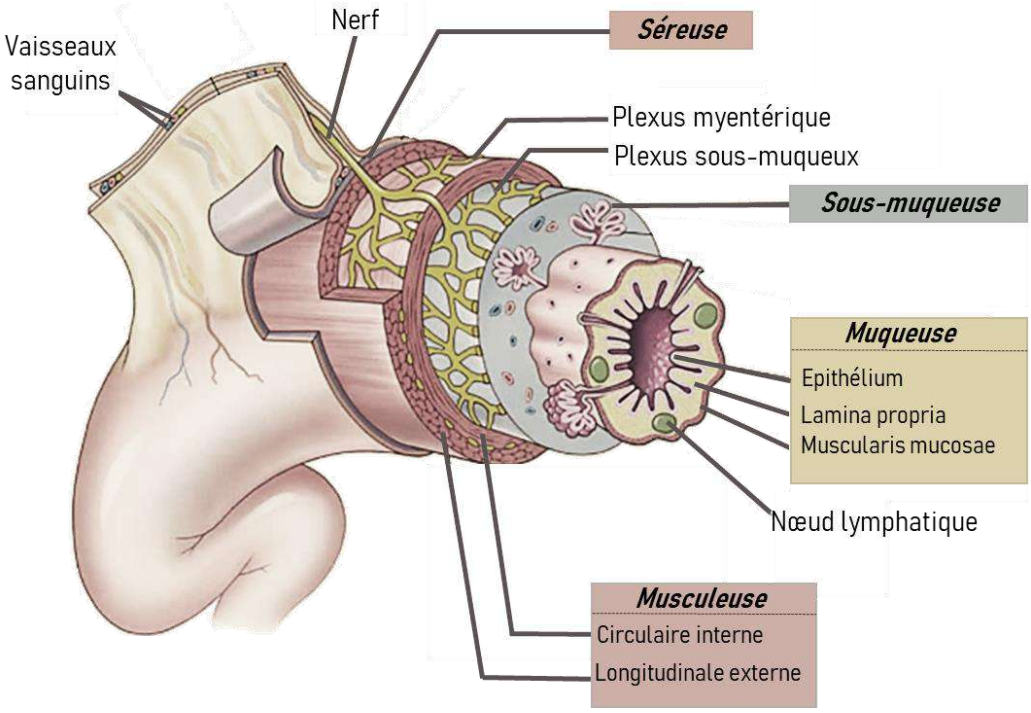


Figure 3 : Structure de la paroi du côlon

Adaptée de Reed & Wickham, 2009 [2]

C. Le développement de l'intestin

Pendant le développement, le TD doit passer d'un simple tube à un organe différencié et mature. Bien que la souris soit souvent utilisée comme modèle, son développement intestinal présente des différences avec celui de l'humain ***(Figure 4).*** Chez la souris, le TD commence sa formation au 6ème jour de gestation, puis les marqueurs intestinaux spécifiques apparaissent à J9. Vers J14, les villosités et les cryptes commencent à se former, mais elles ne seront matures qu'au moment du sevrage 15 à 21 jours après la naissance [3]. Chez l'humain, l'intestin fœtal est structurellement mature à partir de la 19ème semaine de gestation, et les cellules immunitaires sont détectées dans l'intestin dès la 12ème semaine. Chez les deux espèces, la maturation complète de l'intestin ne sera faite qu'au moment du sevrage sous l'influence du microbiote intestinal [4], [5], [6] ***(Figure 4)***.

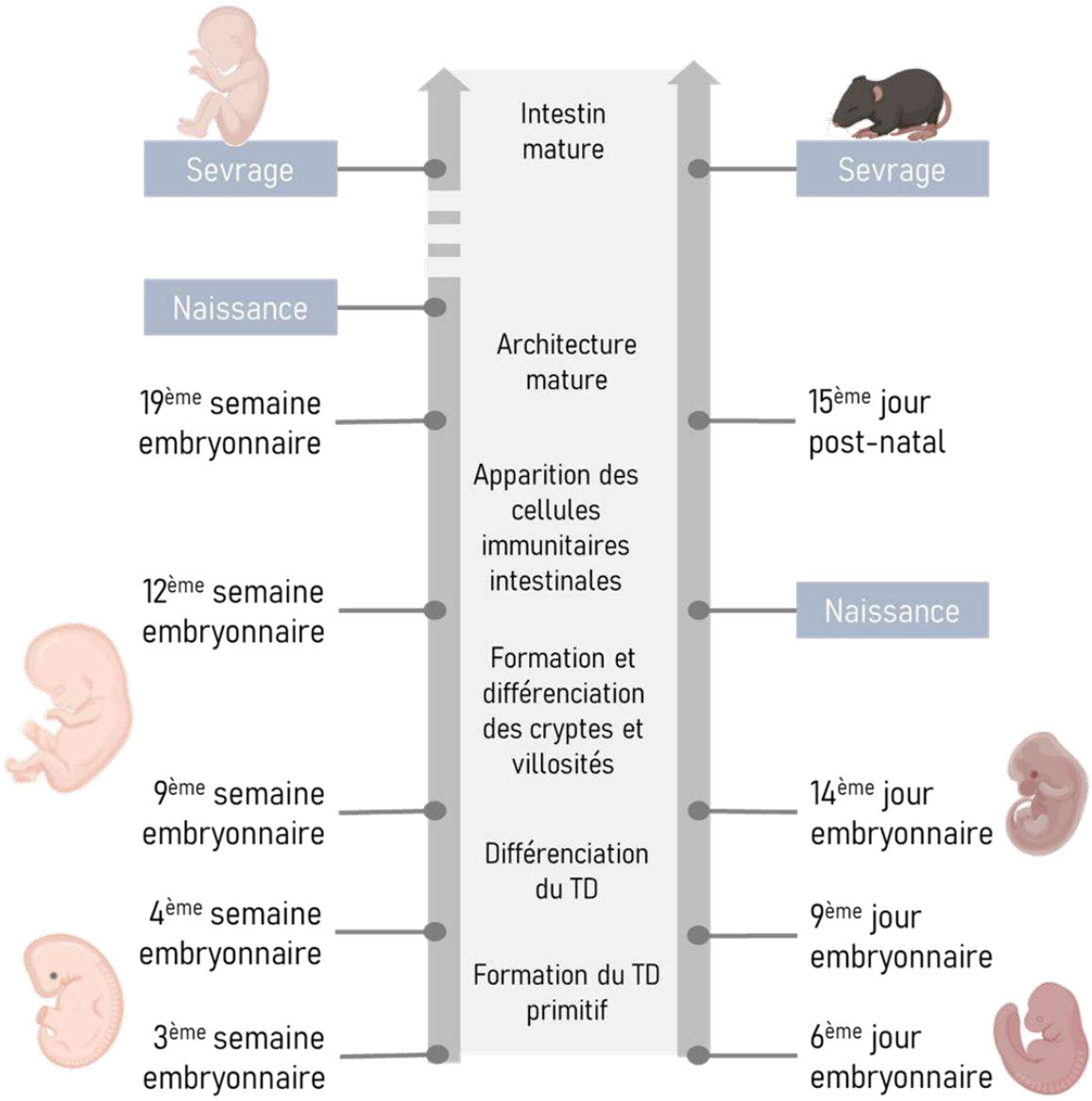


Figure 4 : Le développement de l'intestin

Adaptée de Tourneur et Chassain, 2013 [3]

II. Les cellules épithéliales intestinales

L'épithélium du côlon est une structure dynamique qui permet l'absorption des nutriments et des fluides. Il représente une barrière essentielle contre l'entrée de micro-organismes, commensaux ou pathogènes. En 2019, *Parikh et al*, ont réalisé un séquençage ARN des cellules épithéliales du côlon humain chez des sujets contrôles. Cette étude a permis d'établir que le côlon humain contient 5 types de cellules issues de cellules souches, qui vont donner deux

lignages différents en se différenciant : le lignage absorbant et le lignage sécrétoire [7], [8] ***(Figure 5).***

A. Les cellules non différenciées

L'épithélium intestinal se renouvelle totalement tous les 3 à 5 jours. La présence de cellules souches est donc indispensable à ce renouvellement et au maintien des différentes lignées de cellules. Pour cela, le côlon possède une population de cellules souches actives, les CBC $Lgr5^+$ (Crypt Base Columnar), au fond des cryptes [9], [10]. Les cellules CBC vont ensuite se diviser et se différencier en cellules « early transit amplifying » ou TA, qui sont les cellules progénitrices des lignages absorbant et sécrétoire [9], [10].

B. Le lignage absorbant

1. Les colonocytes

Ces entérocytes sont des cellules épithéliales prismatiques simples, hyperpolarisées, dont la surface apicale est recouverte de microvillosités. Leur extrémité renferme des glycoprotéines membranaires et des glycolipides, ancrées par des liaisons covalentes à la membrane cellulaire. L'ensemble forme une couche, appelée glycocalyx, qui prévient le contact direct avec les micro-organismes et les particules présentes dans la lumière [11], [12].

2. Les cellules BEST4-OTOP2

Décrit pour la première fois par Parikh et al, ce groupe de cellules est spécialisé dans le transport d'ions, de sels et de métaux, mais également dans la recapture de protons en réponse à une diminution du pH extracellulaire. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de BEST4 (Bestrophin-4), d'un canal chlore, d'OTOP2 (Otopetrin 2), d'un canal conducteur de protons, de la cathepsine E, une protéase, et de l'uroguanyline, une hormone de satiété [7].

3. Les cellules M

Les cellules M (microfold cells) sont des cellules spécialisées qui jouent un rôle immunitaire. Elles ont une morphologie particulière puisqu'elles ne possèdent pas de microvillosités à leur pôle apical mais ont des microplis à la place et leur membrane basale est invaginée pour former un sac [13]. Elles échantillonnent le contenu luminal de façon non spécifique par phagocytose et transcytose, et de façon spécifique grâce à différents récepteurs comme la glycoprotéine 2. Ce

récepteur agit comme un récepteur aux pili des bactéries gram$^-$ ou au récepteur des IgA qui leur permettent de transcytoser les bactéries liées aux IgA [13], [14]. Elles transmettent ainsi des antigènes aux cellules immunitaires sous-jacentes qui viennent se loger dans leur membrane basale. Ainsi, elles participent au déclenchement d'une réponse immunitaire ou tolérogène contre les micro-organismes présents [13], [15].

C. Le lignage sécrétoire

1. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes ou « gobelet cells », sont les cellules sécrétrices les plus abondantes au niveau du côlon. Elles représentent environ 16% des cellules épithéliales intestinales (CEI) [10]. Elles possèdent des granules de sécrétion sous leur membrane apicale qui peuvent être déchargées par exocytose. Ces granules contiennent majoritairement des mucines et des trefoil factors qui vont former le mucus tapissant les CEI et participer au maintien de la barrière intestinale [7], [15], [16]. Leur sécrétion est contrôlée par des facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires mais aussi par des polysaccharides comme le LPS (Lipopolysaccharides) et les peptidoglycanes [10], [17].

2. Les cellules entéro-endocrines

Responsables de la production d'environ 30 hormones différentes, elles interviennent dans la régulation de la motilité, de la satiété mais aussi de l'immunité et de l'inflammation. Au niveau du côlon, elles représentent 1% des CEI et sont caractérisées par l'expression de la neurogénine 3, un facteur de transcription nécessaire à la différenciation en cellule endocrine. Elles accumulent leur produit de sécrétion dans des granules cytoplasmiques qui seront sécrétées par exocytose à la membrane basale après un stimulus mécanique, chimique ou neural [18], [19]. Elles sont représentées dans le côlon par 2 familles de cellules : les cellules L et les cellules entérochromaffines. Les cellules L produisent du PYY (Peptide Tyrosine Tyrosine), du GLP-1 (Glucagon Peptide Like 1) et du GLP-2 (Glucagon Peptide Like 2) ; les deux premières étant des hormones anorexigènes et la troisième une hormone agissant sur la motilité gastrique. Les cellules entérochromaffines sont responsables de 95% de la production de sérotonine de l'organisme [18].

3. Les tufts cells

Uniquement décrites chez les rongeurs, leur fonction n'est encore que peu définie. Récemment, un rôle dans l'immunité de type 2 leur a été attribué grâce à leur capacité de détection des helminthes et l'expression constitutive d'IL-25 [15], [20].

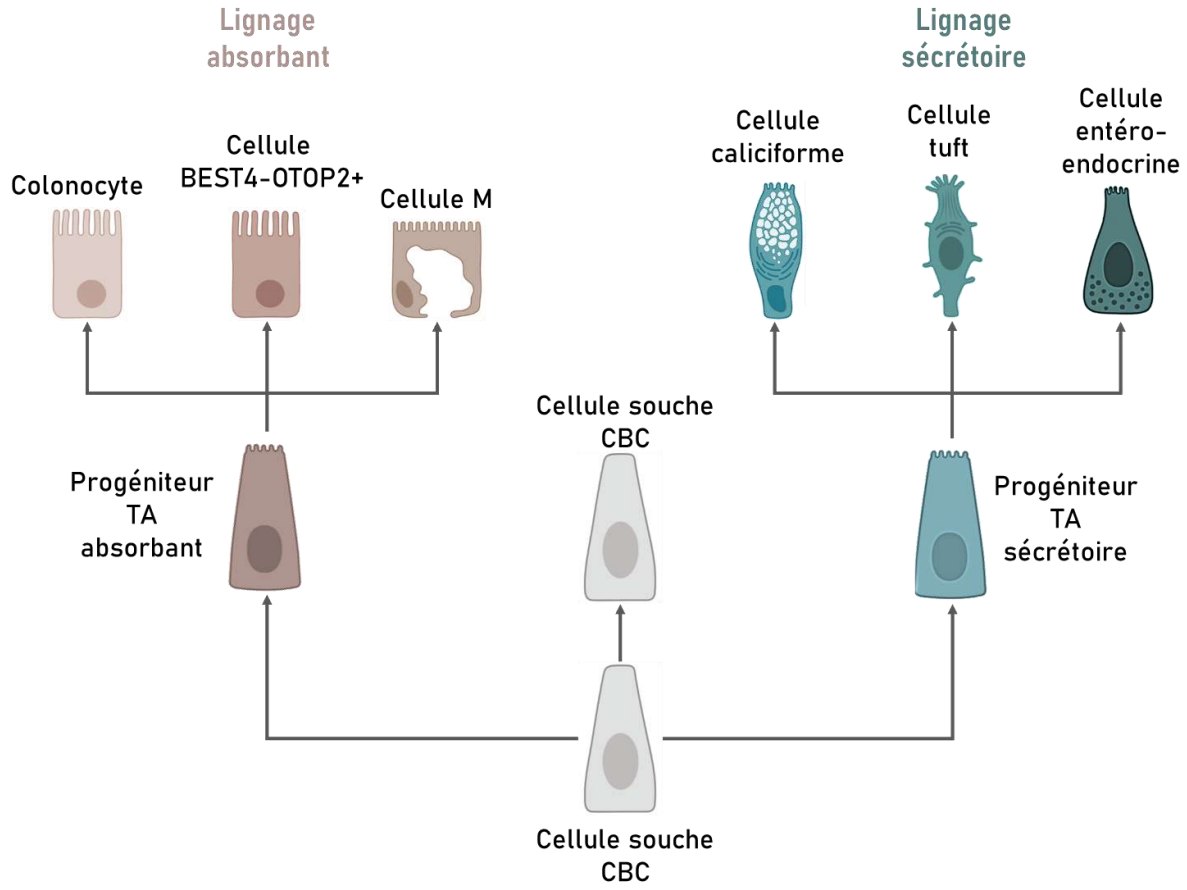


Figure 5 : Les cellules épithéliales du côlon

(TA = Transit amplifying)

III. Les récepteurs et transporteurs des lipides présents dans les cellules épithéliales du côlon

Longtemps étudiés pour leur rôle énergétique et de constituant des membranes, la fonction des lipides a récemment été étendue à leur impact en tant que molécules bioactives. Plusieurs rôles leur ont été attribués dans l'inflammation, la douleur ou encore la régulation de l'expression génique.

Un des objectifs de ce travail a été d'étudier l'impact d'acides gras à longue chaîne (AGLC) bactériens libres sur l'hôte au niveau des CEI. Pour cela, différents mécanismes d'entrée coexistent au niveau du côlon : la diffusion passive par « flip-flop » et la diffusion facilitée via des transporteurs. L'importance de chacun de ces deux mécanismes dans le transport des AGLC est controversée et semble dépendre du microenvironnement dans lequel se trouve le tissu [21] **(*Figure 6).*** Les effets des acides gras (AG) sont médiés par des récepteurs membranaires et des récepteurs nucléaires présents dans les cellules épithéliales.

A. Le flip-flop lipidique

Les AG libres peuvent diffuser par « flip-flop » à travers la bicouche lipidique des CEI. Pour cela, ils passent d'une couche lipidique à l'autre par un mouvement de bascule. Les AG sont ensuite dissociés de la membrane lipidique et diffusent dans la cellule [22]. Ce principe est valable pour les AG à courte chaine (moins de 6 atomes de carbone, AGCC), moyenne chaine (6 à 12 atomes de carbone AGMC) et longue chaîne (plus de 12 atomes de carbone, AGLC) [22]–[24] ***(Figure 6).***

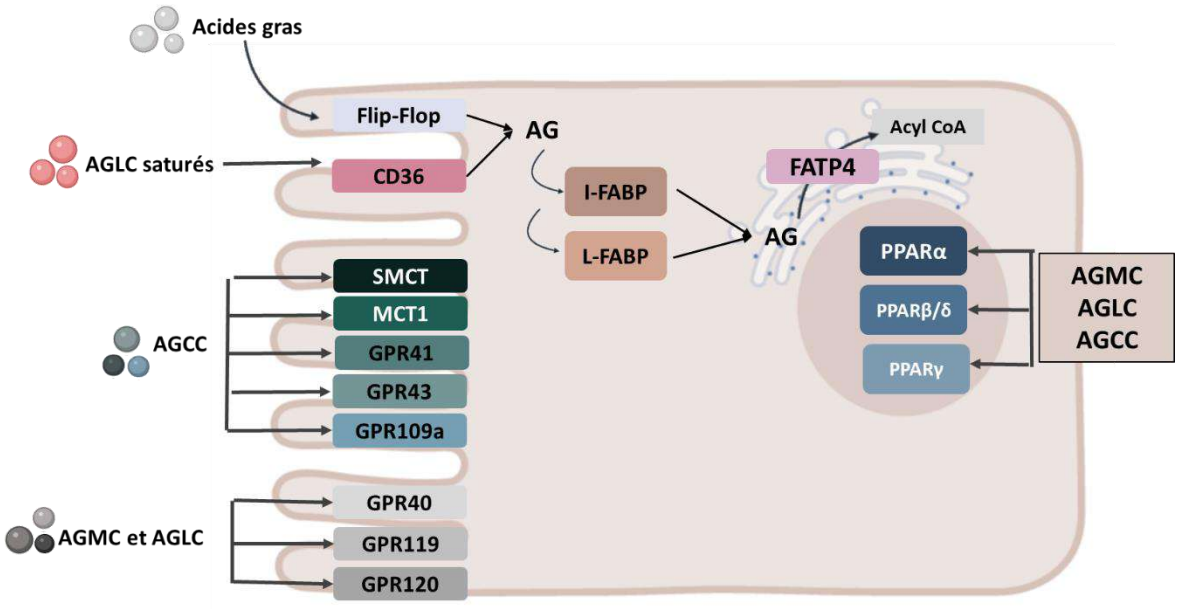


Figure 6 : Les récepteurs et transporteurs des lipides dans les CEI

B. Les transporteurs

La diffusion facilitée grâce à des transporteurs peut également être utilisée par les AGLC afin d'entrer dans les CEI. Le transporteur CD36 (cluster of differenciation 36), aussi appelé FAT (fatty acid translocase), participe principalement à l'absorption des acides gras saturés. Peu exprimé au niveau du côlon, il est surtout retrouvé à la surface des cellules entéro-endocrines de l'intestin grêle [25], [26], [27], [28]. En intra-cellulaire, trois transporteurs sont exprimés : FATP4 (Fatty Acid Transport Protein), I-FABP (Intestine Fatty Acid Binding Protein ou FABP2) et L-FABP (Liver-Fatty Acid Binding Protein ou FABP1) [28]. FATP4 est localisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et participe à la synthèse d'acyl-CoA [29], [30], [26]. Sa délétion est létale pour le fœtus ce qui complique l'étude de son rôle dans l'absorption des AG libres [29], [31], [26]. Les FABP sont cytosoliques et permettent le transfert des AG au RE [23]. Les AGCCs possèdent des transporteurs spécifiques MCT1 (Monocarboxylate Transporter Isoforme 1) et SCMT (Sodium-Coupled Monocarboxylate Transporter) [32] **(*Figure 6)***.

C. Les récepteurs membranaires

Les AG possèdent six récepteurs membranaires couplés à des protéines G (RCPG) à la surface des CEI. Les GPR41, 43 et 109a pour les acides gras à courte chaîne, et les GPR40, 119 et 120 pour les acides gras à moyenne et longue chaîne ***(Figure 7).***

1. Les récepteurs aux acides gras à courte chaîne (AGCC)

GPR41, anciennement FFAR2 (Free Fatty Acid Receptor), est couplé à une protéine $G_{\alpha i}$. Son activation inhibe la production d'AMPc et active la cascade de phosphorylation ERK1/2 [33], [23]. GPR43 (FFAR3), comme GPR41, est couplé à une protéine $G_{\alpha i}$, mais également à une protéine $G_{\alpha q}$ dont l'activation augmente la concentration de Ca^{2+} intracellulaire [33], [23]. Fortement exprimés au niveau des cellules entéro-endocrines, leur activation stimule la sécrétion de GLP-1 et de PYY 21]. Le GPR109a ou HCA2, initialement identifié comme récepteur de la niacine, est également activé par le butyrate (4 carbones), mais pas par le propionate (3 carbones) ni l'acétate (2 carbones). Il est couplé à une protéine $G_{\alpha i}$ ce qui va diminuer l'AMPc intracellulaire via l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) 21]. Son expression au niveau du côlon est partiellement conditionnée par la présence du microbiote intestinal puisque son expression est fortement diminuée dans les

souris axéniques qui ne possèdent pas de microbiote [21]. L'activation de ce récepteur par le butyrate a une activité anti-inflammatoire et anti-cancéreuse au niveau du côlon [21] **(*Figure 7)***.

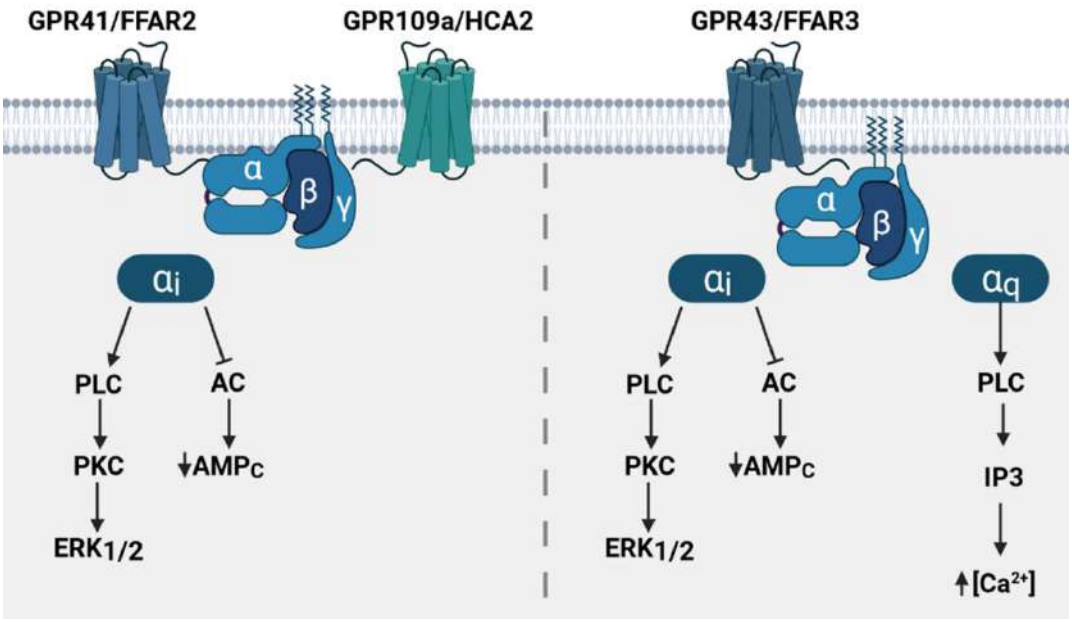


Figure 7 : Les récepteurs des acides gras à courte chaîne

2. Les récepteurs aux acides gras à moyenne et longue chaîne

Les récepteurs GPR40 et GPR120 (anciennement FFAR1 et 4) lient les AG à moyenne et longue chaîne. Ils activent une protéine $G_{\alpha q}$ qui va augmenter la concentration calcique intracellulaire via la formation d'IP3. La formation de diacyl glycerol (DAG) et l'activation de la PKC activent la voie de phosphorylation ERK1/2. Celle-ci entraîne la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéro-endocrines. GPR40 peut également être couplé à une protéine $G_{\alpha s}$ augmentant l'AMPc intracellulaire par l'AC, ou à une protéine $G_{\alpha i}$ diminuant l'AMPc intracellulaire via l'inhibition de l'AC [21]. *In vitro,* dans une lignée cellulaire colonique humaine, les Caco-2, l'activation de GPR120 possède un rôle anti-inflammatoire à travers l'inhibition de NFκB [23] **(*Figure 8)***. Les AGLC sont également reconnus par le GPR119 qui est surtout exprimé au niveau des cellules entéro-endocrines. Il est activé par les 2-monoacylglycérols et active la sécrétion de GLP-1 via une protéine $G_{\alpha s}$ et l'augmentation de l'AMPc [34]**,** [23] ***(Figure 8)***.

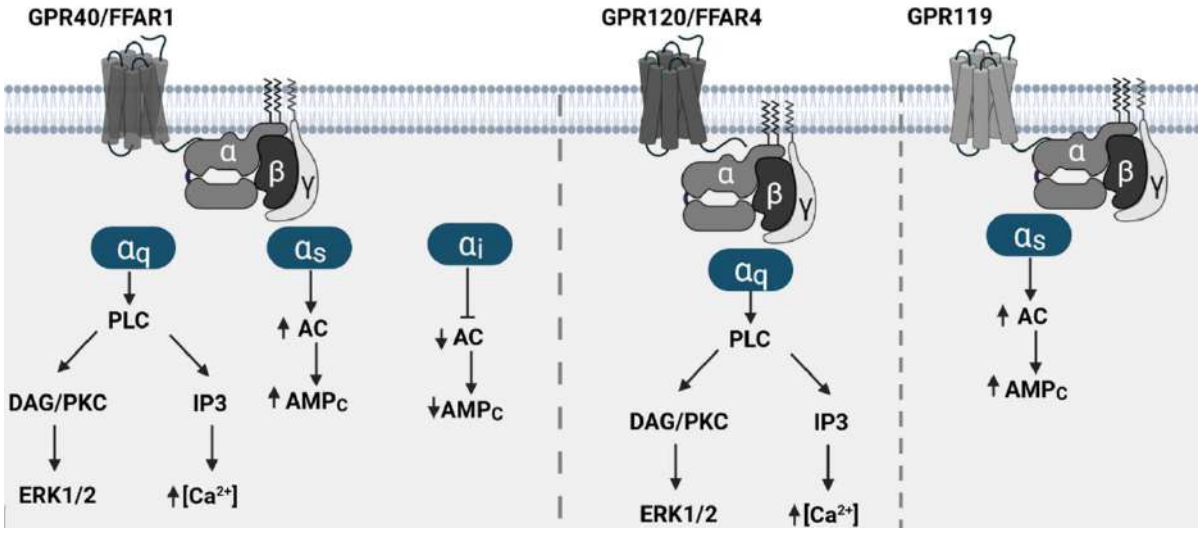


Figure 8 : Les récepteurs aux acides gras à moyenne et longue chaîne

D. Les récepteurs nucléaires PPAR

Les PPARs, (Peroxysomes Proliferator Activated Receptor), font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones activés par des ligands [35], [36]. A ce jour, 3 isoformes des PPARs ont été découvertes : PPARα (NR1C1), PPARγ (NR1C2) et PPARβ/δ (NR1C3), et sont chacun produit par un gène différent. Ils partagent une structure commune et leur large poche de liaison leur permet d'interagir avec un spectre étendu d'agonistes synthétiques (WY14643 pour PPARα et Cirpofibrate pour PPARγ, par exemple) et de lipides naturels [35], [36]. Ils forment des hétérodimères avec RXR (Retinoid X receptor) inactivés par des corépresseurs. La fixation des ligands permet la dissociation des corépresseurs et la fixation de coactivateurs. L'hétérodimère va alors se fixer sur des séquences ADN spécifiques, les PPRE (Peroxysome Proliferator Response Elements), ce qui va modifier la transcription des gènes cibles [35] ***(Figure 9)***. Les PPARs sont impliqués dans le contrôle du métabolisme énergétique, dans l'inflammation et dans les réponses immunitaires [36]. Ils représentent un lien direct entre les acides gras présents dans le milieu et les modifications d'expression génique et régulent notamment l'expression de CD36 [22].

PPARα régule le relargage de médiateurs pro-inflammatoires via l'inhibition de voies de signalisation pro-inflammatoires comme NFκB, une voie de signalisation importante dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire [35], [37][37]. De plus, c'est un

régulateur majeur de la beta oxydation mitochondriale des acides gras, de la synthèse des corps cétoniques et du métabolisme lipidique systémique [38]. Il est activé par des lipides endogènes comme le 8-HETE (Acide 8-hydroxyeicosatétraénoïque) et le LTB4 (Leukotriène B4) [39], [40]. Dans des modèles de colites induites par le DSS (dextran sulfate sodium) ou TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid), son activation diminue la sévérité de la colite [34].

PPARγ possède deux isoformes, PPARγ1, exprimé dans de nombreux tissus (intestin, cerveau, cellules immunitaires, cellules vasculaires) et PPARγ2 dont l'expression est restreinte au tissus adipeux [34]. Au niveau du côlon, son expression est importante et renforcée par l'activation de TLR4 (toll like receptor 4) par des molécules bactériennes [34]**.** Dans l'intestin, il est exprimé par les cellules épithéliales, les macrophages et les lymphocytes T [34]**.** PPARγ participe également à la communication entre le microbiote et l'hôte, puisque le butyrate et le propionate, deux AGCC produits par le microbiote intestinal, induisent une activité transcriptionnelle dépendante de PPARγ [38]. Il est aussi activé par des AG endogènes à longue chaîne comme l'acide linoléique, le 15-HETE (Acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque), ou la PGD_2 (Prostaglandine D2).

PPARβ/δ est le moins étudié des PPARs au niveau intestinal [38]. Sa délétion chez des souris IL10-/- développant une colite, exacerbe l'inflammation [34]. Dans certaines études, l'utilisation de son agoniste synthétique (GW0742) n'a pas d'effet sur l'intensité de la colite dans le modèle IL10-/-. D'autres études décrivent une exacerbation de l'inflammation dans ce même modèle [34]). Le rôle exact de PPARβ/δ dans l'inflammation intestinale est donc encore incertain.

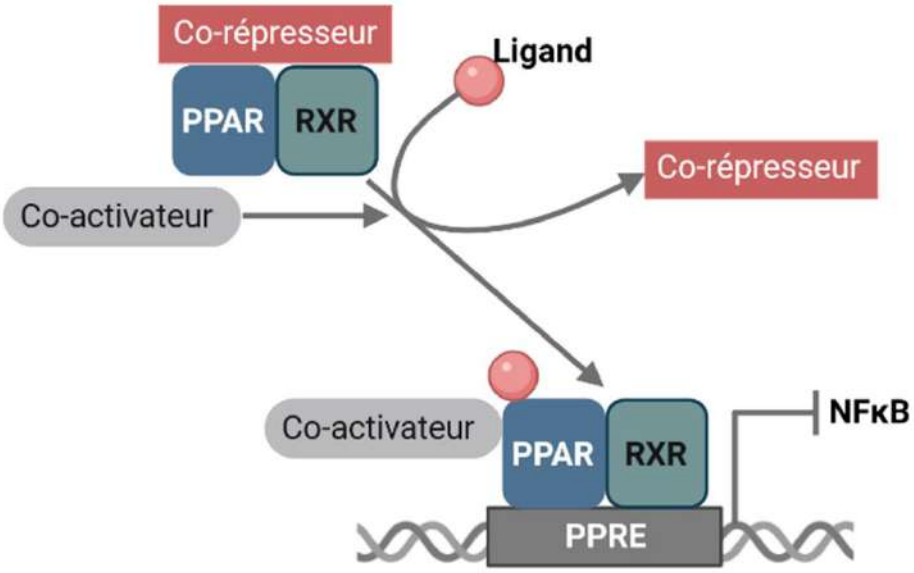


Figure 9 : L'activation des récepteurs nucléaires PPAR

IV. La fonction de barrière

A. Généralités

Le tractus digestif possède différentes fonctions qui lui permettent d'assurer ses rôles énergétiques, endocriniens et de protection. Le rôle énergétique comprend l'ingestion des aliments, leur digestion mécanique et chimique, l'absorption des nutriments et l'élimination des déchets. Au niveau endocrinien, l'intestin est responsable de la sécrétion d'hormones, régulant différentes fonctions telles que : la satiété, la motilité intestinale ou encore la sécrétion d'acides biliaires. Le contenu luminal, en plus des aliments ingérés, est constitué de micro-organismes commensaux et pathogènes qui représentent un risque d'infection. C'est pourquoi, le TD possède une fonction de protection finement régulée et répartie en quatre niveaux de barrière : physique, chimique, immunologique et microbienne. L'altération de la fonction de barrière est notamment liée au développement d'inflammation intestinale et contribue à différentes maladies intestinales inflammatoires comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique [41]. Cette fonction majeure pour le maintien de l'homéostasie sera la seule développée dans ce manuscrit.

B. Une barrière physique

1. Les interactions cellule/cellule

Les CEI sont liées entre elles par différentes structures protéiques assurant le maintien de la structure de l'épithélium mais aussi le passage de différentes molécules. Trois grandes familles de jonctions réparties du pôle apical au pôle basal de la cellule existent au niveau intestinal : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes.

a) Les jonctions serrées

Au niveau apical, les CEI sont liées par des jonctions serrées ou « tight junctions » (TJ) [42], [43]. Ces structures protéiques dynamiques créent une barrière semi-perméable et contrôlent le passage paracellulaire des molécules. En effet, ouverte, une TJ possède un pore de 5 nm de diamètre qui permet le passage de macromolécules ayant une taille comprise entre 4000 et 5500 Da [44]. Les TJ sont composées de quatre types de protéines transmembranaires : les claudines, les molécules d'adhésions jonctionnelles (JAM), la tricelluline et les occludines assurant la stabilité des TJ. Les domaines intracellulaires de ces protéines interagissent avec les zona occludens (ZO), protéines d'échafaudage ancrées au cytosquelette d'actino-myosine, assurant le maintien de la structure et de l'intégrité des TJ [43], [45] ***(Figure 10).***

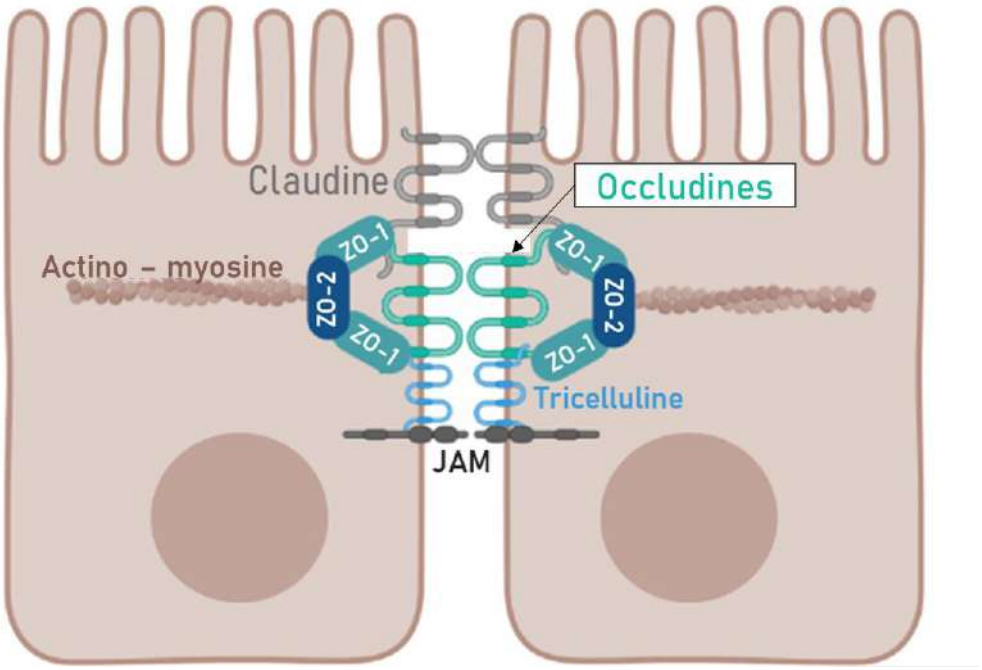


Figure 10 : Les jonctions serrées

b) Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes ou zonula adherens sont constituées de E-cadhérines transmembranaires, associées à des protéines cytoplasmiques comme la β-caténine et la caténine p120. Elles sont associées aux filaments d'actine par l'α-caténine et cette structure permet l'adhésion des CEI entre elles [46] ***(Figure 11).***

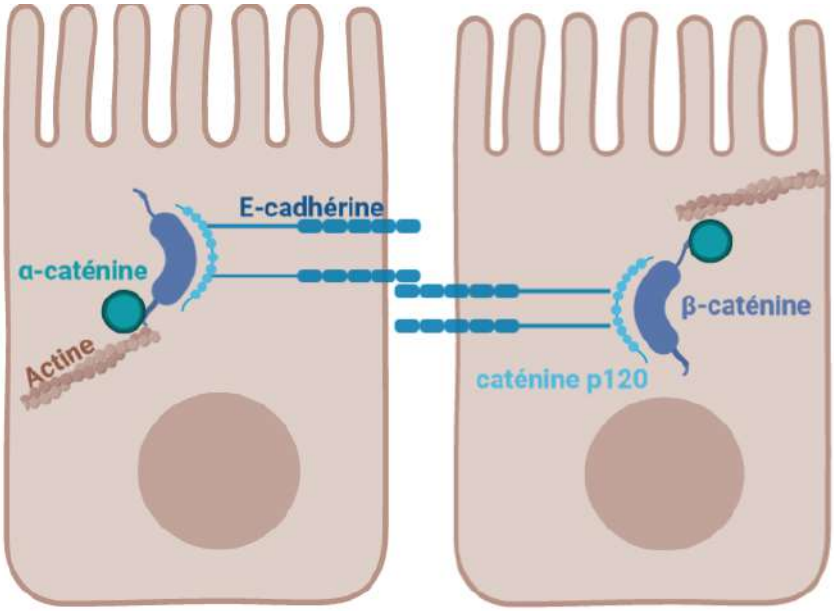


Figure 11 : Les jonctions adhérentes

c) Les desmosomes

Au pôle basal des CEI, les desmosomes assurent la stabilité mécanique de l'architecture de l'épithélium intestinal. Composés de cadhérines desmosomales transmembranaires, de desmogléines et de desmocollines, ancrées aux plakoglobines et plakophilines, ils sont liés au cytosquelette d'actine par les desmoplakines [47] ***(Figure 12).***

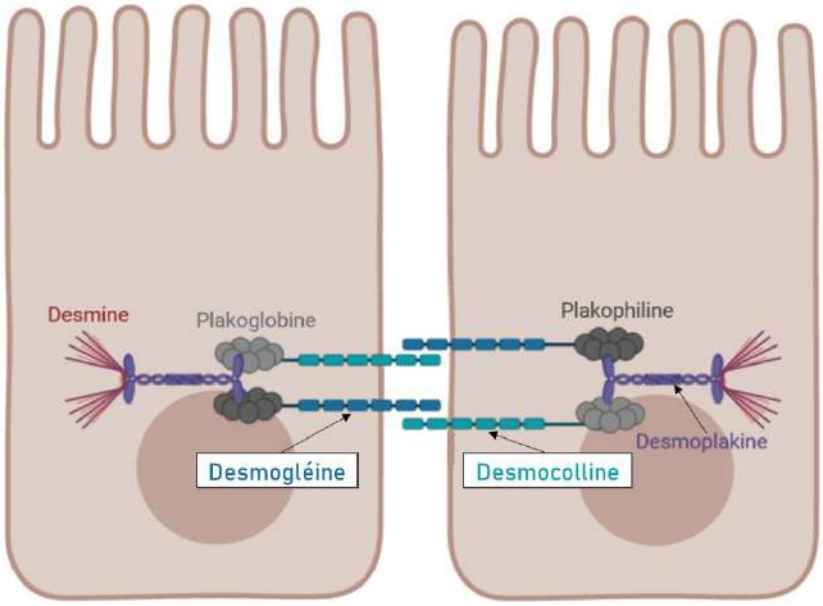


Figure 12 : Les desmosomes

2. Les interactions cellule/matrice

Le pôle basal des CEI repose sur la matrice extracellulaire (MEC) sécrétée par les cellules épithéliales et stromales environnantes. La MEC est un réseau de peptidoglycanes et de glycoprotéines qui participe au maintien de la structure de l'épithélium intestinal via des structures protéiques, les hémi-desmosomes. Grâce à leurs intégrines, ils s'ancrent aux laminines de la lame basale. Cette interaction participe à l'établissement de la polarité, de la croissance et de la différenciation des CEI [48] ***(Figure 13).***

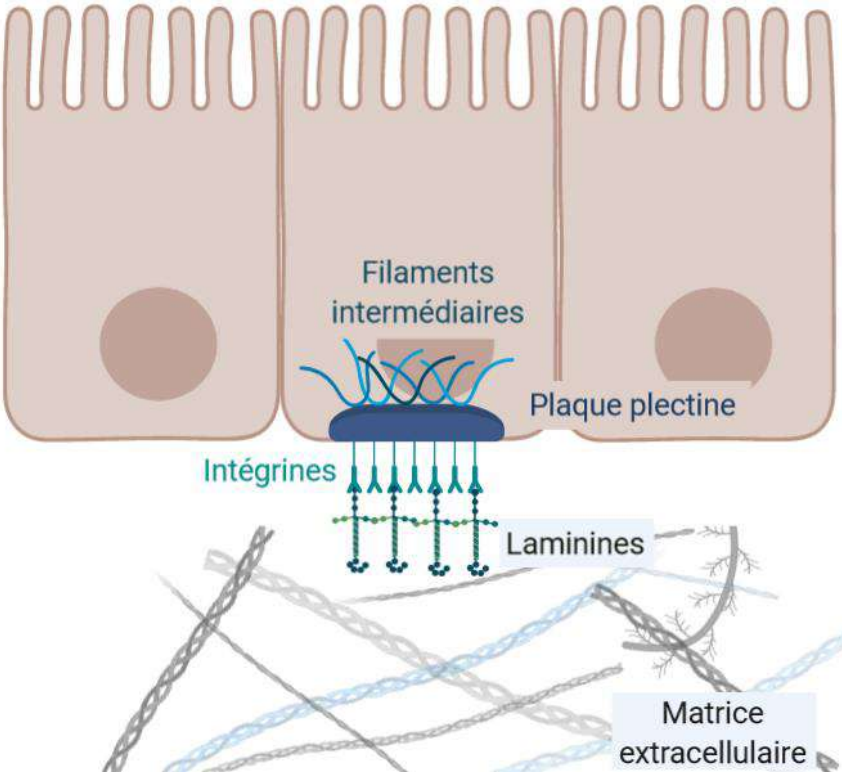


Figure 13 : Les interactions cellule / matrice

3. Le mucus

Le mucus qui tapisse le pôle apical des CEI forme une protection contre l'invasion par des micro-organismes et contre les dommages infligés par les irritants contenus dans la lumière intestinale. Contrairement à l'intestin grêle où il n'est constitué que d'une seule couche, il est formé de deux couches au niveau du côlon [49], [50]. La couche interne, est stérile et fermement attachée aux CEI [49]–[51]. La couche externe, lâche, est l'habitat naturel des bactéries commensales qui utilisent les mucines et les peptydoglycanes qui le composent comme source de nutriments [49], [52]Les mucines, composantes majeures du mucus, sont sécrétées par les cellules caliciformes de l'intestin et existent sous deux formes, membranaires et sécrétées. Les mucines membranaires (mucines 3, 4, 13, et 17 constitutivement et la mucine 1 dont l'expression est augmentée en cas d'infection), forment le glycocalyx à la surface des CEI. Les mucines sécrétées (mucine 2 uniquement au niveau du côlon), forment le gel de mucus et permettent la structuration du mucus en 3D, au niveau des couches interne et externe [16], [50], [51]. La déplétion génétique de MUC2 entraîne une perte de la couche interne du mucus ainsi qu'une infiltration bactérienne déclenchant une inflammation du côlon, révélant son rôle essentiel dans

la fonction de barrière [49], [52]. D'autres protéines, telles, que le trefoil factor 3 (TFF3), permettent un maintien de l'intégrité du mucus en stabilisant les mucines [45], [49] ***(Figure 14).***

C. Une barrière chimique

Pour réguler les micro-organismes présents dans la lumière, les CEI produisent des peptides anti-microbiens (PAMs) : les cathélicidines, les α-défensines et β-défensines, les molécules resistin-like (RELM) et RegIIIγ. Ces molécules d'une taille inférieure à 60 acides aminés et qui agissent sur un large spectre de micro-organismes sont produites en majorité par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle [53]. Au niveau du côlon, les cellules de Paneth n'existent pas, ce sont les CEI et les cellules immunitaires présentes qui les sécrètent de façon constitutive ou induite par les pathogènes ou les molécules inflammatoires. Les PAMs contribuent au maintien à distance de la flore intestinale en ciblant des régions conservées des membranes bactériennes pour y former des pores et induire la lyse cellulaire [7], [12], [51], [54] **(*Figure 14)***.

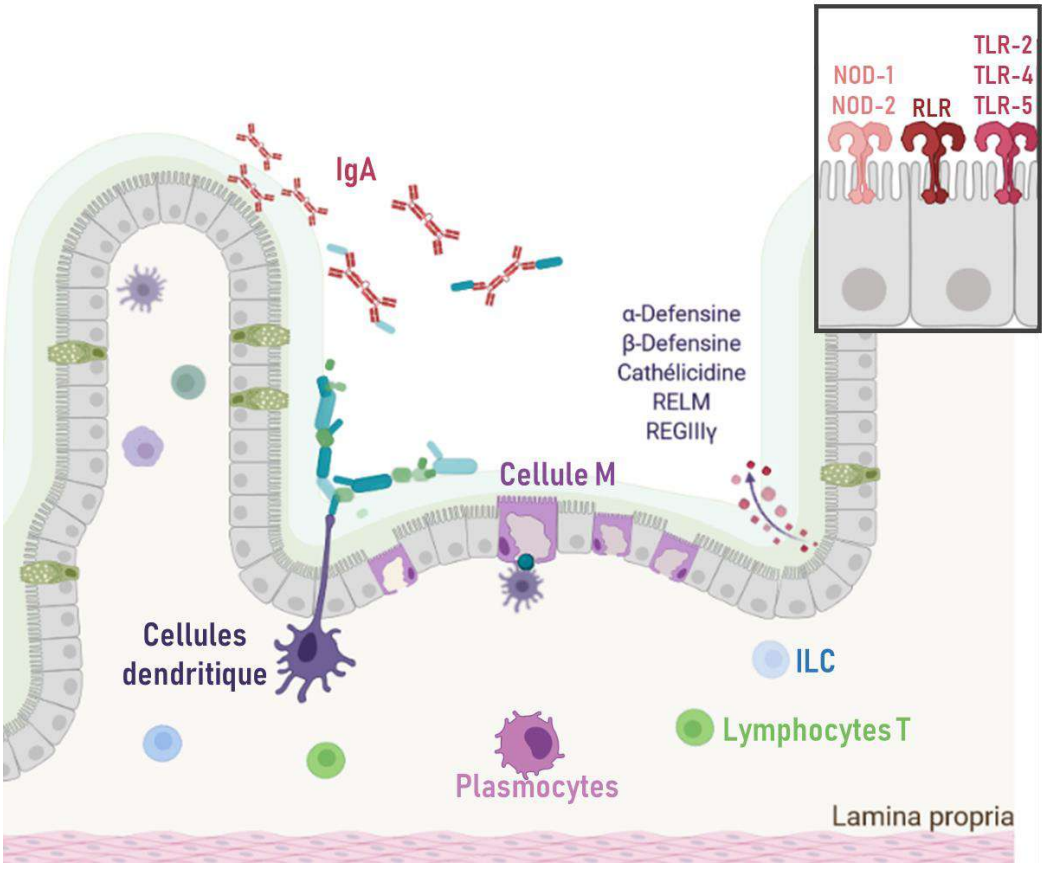


Figure 14 : La fonction de barrière

D. Une barrière immunologique

1. L'épithélium intestinal

Les CEI ont un rôle de sentinelles de l'épithélium intestinal grâce à leur fonction de barrière physique, mais également grâce à leur rôle de reconnaissance des micro-organismes luminaux. Cette reconnaissance se fait via des PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui reconnaissent les PAMPs (Pathogens Associated Molecular Pattern), puis elles transmettent les informations au système immunitaire inné en sécrétant des interleukines [45]. Les PRRs comprennent différents types de récepteurs : les NLRs, les RLRs et les TLRs. Les NLRs (NOD like receptors), NOD-1 et NOD-2, sont activés en réponse aux peptidoglycanes bactériens. Les RLRs (RIG-like receptors) reconnaissent les virus et les TLRs ou toll like receptors reconnaissent différents fragments bactériens ou viraux [15], [55]. En condition basale, les CEI du côlon expriment les TLR2, TLR4 et TLR5 qui reconnaissent respectivement les lipoprotéines, le LPS et la flagelline bactérienne [45], [55], [56]. La liaison des TLRs et des NLRs à leur ligand active la voie de signalisation NFκB (Nuclear Factor-kappa B) en recrutant des molécules adaptatrices comme MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) ou TRIF (TIR domain containing adaptator inducing Interferon β). Ces deux molécules conduisent ensuite à l'activation de la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) puis l'activation de NFκB. Ce facteur de transcription augmente l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme TNFα, IL1-β, ou IL-6. PPARα et PPARγ inhibent l'activation de NFκB

en diminuant son expression, en augmentant la transcription de IκB, un régulateur négatif de NFκB, ou en favorisant la dégradation de p65, une sous-unité de NFκB [35], [57], [58] **(*Figure 15)***.

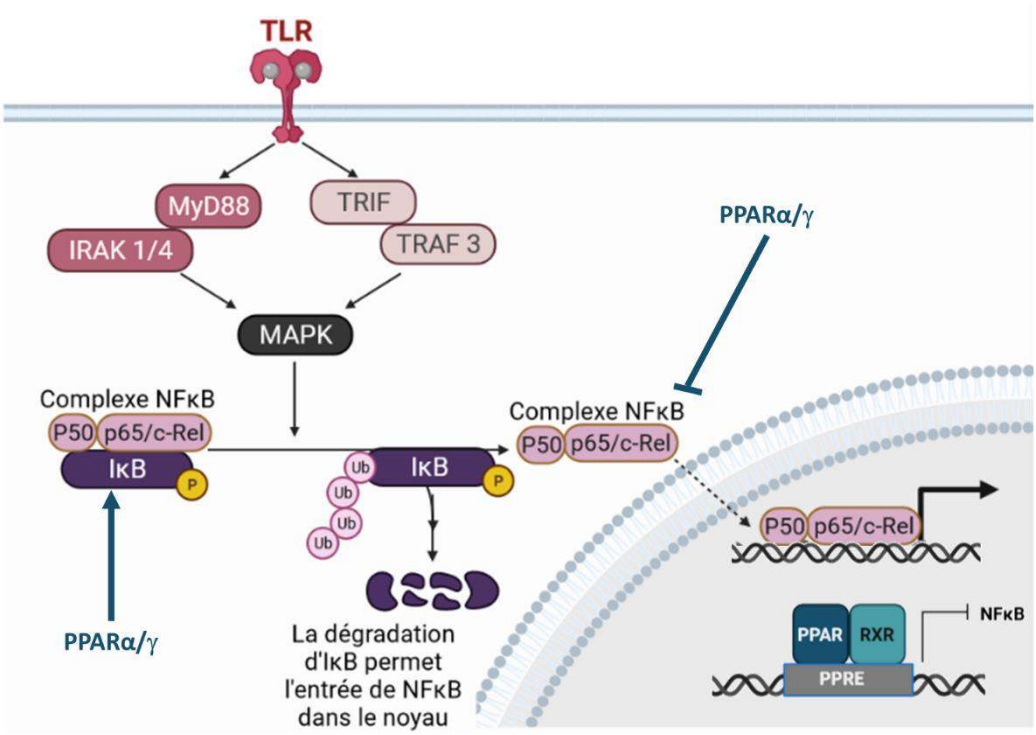


Figure 15 : La voie NFκB est régulée par PPARα et PPARγ

Au niveau apical, les CEI sont recouvertes d'une couche d'immunoglobulines A (IgA) qui sont sécrétées par les plasmocytes présents dans la lamina propria et qui sont transportées dans la lumière par les CEI [45], [52]. Ces IgA ont un rôle important de maintien de la population commensale de micro-organismes et de neutralisation des pathogènes. Les cellules épithéliales spécialisées dans l'échantillonnage de la lumière, les cellules M, sont concentrées en follicules associés à l'épithélium. Elles sont capables d'échantillonner la lumière de façon non spécifique par transcytose, mais également grâce à la glycoprotéine de surface GP2 qui agît comme un récepteur aux protéines des pili bactériens. Les antigènes les plus petits (<70 kDa) peuvent également être transportés par les cellules caliciformes. Ce phénomène participe à l'établissement de la tolérance périphérique [43], [45]. La présence de micro-organismes dans l'intestin est physiologique et la reconnaissance de micro-organismes ne doit pas systématiquement mener à une réponse inflammatoire. Les cellules épithéliales intestinales ont donc un rôle important dans la coordination entre la tolérance et la réponse anti-pathogènes [45].

2. Les structures immunologiques de l'intestin

L'intestin représente la plus grande surface de contact avec l'extérieur du corps humain. Constamment au contact des micro-organismes présents dans la lumière, il doit être capable d'en réguler la croissance et de limiter leur entrée dans l'organisme. C'est pourquoi, 60 à 70% des lymphocytes périphériques sont présents dans l'intestin, ce qui en fait le plus grand tissu immunologique périphérique [59]. Une grande partie de ces cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, ILC (Innate Lymphoid Cells), lymphocytes T effecteurs, Lymphocyte T régulateurs, et plasmocytes) sont contenues dans la lamina propria mais quelques lymphocytes interstitiels sont également intercalés entre les CEI [59]. Dans la lamina propria, ces cellules sont organisées en GALT (Gut Associated Lymphoid Tissues) qui regroupent différentes structures comme les crypto-plaques (CP), les follicules lymphoïdes isolés (ILF) et les plaques de Peyer (PP) exclusivement au niveau de l'intestin grêle. Les GALTs et les nœuds lymphatiques mésentériques (mLN) sont les lieux principaux de l'amorçage de la réponse immunitaire dans l'intestin et contiennent 80% des cellules immunitaires de l'intestin [60], [59], [61], [62]. Les cellules dendritiques présentes dans la lamina propria pénètrent l'épithélium via leurs dendrites pour échantillonner les antigènes présents dans la lumière et ainsi initier une réponse immunitaire avant que la barrière intestinale ne soit compromise [43].

E. Une barrière microbienne

Les bactéries commensales, elles aussi, jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal via différents mécanismes. Par des phénomènes de compétition avec les autres micro-organismes, elles empêchent la colonisation de l'intestin par des pathogènes. De plus, par leurs interactions avec les cellules de l'hôte, elles régulent la sécrétion de mucines, de PAM, des TLRs, mais aussi des IgA et des protéines de jonctions serrées [63]. Le chapitre II de cette thèse sera consacré au microbiote et à ses fonctions.

F. L'altération de la barrière

L'altération des différents composants de la barrière intestinale favorise le développement d'une inflammation de la muqueuse engendrée par l'entrée de micro-organismes dans la paroi intestinale. Ce phénomène a été démontré pour la première fois en 1995 par Hermiston &

Gordon [64], dans un modèle de souris chimères où l'adhésion des cellules entre elles était altérée grâce à l'utilisation d'un transgène dominant négatif de la cadhérine. Chez ces souris, une inflammation de la lamina propria s'était développée spécifiquement où le transgène était exprimé, c'est-à-dire là où la barrière épithéliale intestinale était altérée [64], [65]. Le même phénomène est retrouvé dans un modèle murin de colite induite par le DSS (Dextran Sulfate Sodium) un polysaccharide chargé négativement [66]. Ce modèle permet de reproduire des phases d'inflammation puis de résolution unique ou à répétition.

L'administration de DSS dans l'eau de boisson des souris créé des dommages de l'épithélium intestinal et une augmentation de la perméabilité intestinale puis l'apparition d'une inflammation aigüe localisée au niveau du côlon [66]. Les effets du DSS commencent dès le premier jour post-traitement avec une modification de l'expression des protéines de jonctions serrées et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Puis apparaissent des symptômes plus sévères comme l'augmentation de la perméabilité intestinale ou une hémorragie favorisée par l'effet anti-coagulant du DSS qui peut être fatale [66]. L'exposition au DSS reproduit chez le rongeur les symptômes cliniques des maladies inflammatoires chroniques intestinales : perte de poids, diarrhée et sang dans les selles. Macroscopiquement, le côlon se raccourcit et s'épaissit. Au niveau histologique, l'intestin présente typiquement une déplétion des cellules caliciformes, une infiltration de cellules immunitaires dans la lamina propria et la sous-muqueuse, ainsi qu'une érosion des cryptes. Moléculairement, le DSS induit la production de médiateurs pro-inflammatoires cytokiniques (TNFα, IFNγ, IL1β) et lipidiques dérivés des AG poly-insaturés qui vont apparaître en deux phases. La première pendant l'inflammation, où des AG pro-inflammatoires comme la PGE_2 (Prostaglandine E2), la TXB_2 (Thromboxane B2) ou le LTB_4 (Leucotriène B4), puis la seconde pendant la résolution avec la production de résolvines, de protectines, de marésines et de lipoxines [66]–[68].

Dans ce modèle, l'absence de TLR2, TLR4 ou NOD2, et donc d'une reconnaissance fonctionnelle du microbiote, exacerbe la sévérité de la colite [65], [69] alors que l'absence de lymphocytes T n'empêche pas le développement de la colite, montrant l'importance de l'immunité innée dans le développement de l'inflammation intestinale [65]. De plus, le traitement de souris axéniques par du DSS n'induit pas le développement d'inflammation du côlon qui apparaît rapidement une fois que les souris sont colonisées. Ces études démontrent l'implication du microbiote et de sa reconnaissance dans le développement de l'inflammation du côlon [70].

V. L'innervation intestinale

A. Généralités

Le système nerveux gastro-intestinal est un système intégré qui inclu les réflexes entériques locaux, ceux passants par le système nerveux sympathique et les signaux intégrés au niveau du système nerveux central (SNC) [57], [71]. Le tractus digestif est le seul organe périphérique possédant un système nerveux intrinsèque, capable de fonctionner indépendamment du système nerveux central (SNC) [57], [72], [73].

B. Le système nerveux entérique intrinsèque

Le système nerveux entérique intrinsèque (SNE) regroupe 200 à 600 millions de neurones chez l'humain et 80 à 100 millions chez les rongeurs, soit plus que le système sympathique et parasympathique réunis et environ autant que la moelle épinière [57], [74]. Chez l'humain, la colonisation de l'intestin par les neurones du système nerveux entérique débute pendant la 4ème semaine de gestation et se termine pendant la 7ème semaine [75], [76], [77]. Comme l'intestin, sa maturation n'est complète qu'au moment de l'établissement du microbiote intestinal [74]. Composé de cellules nerveuses, de cellules interstitielles de Cajal (cellules « pace-maker » de l'intestin) et de cellules gliales, il est réparti en deux plexi ganglionnés. Le plexus sous-muqueux, ou de Meissner, est situé entre la sous-muqueuse et la musculeuse et n'est présent qu'au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Le plexus myentérique, ou d'Auerbach, est compris entre les deux couches musculeuses de l'intestin et est le premier des deux à s'établir lors de l'embryogénèse [75] [76], [77]. Le SNE exerce différents rôles tels que le contrôle local de la digestion, de la motilité et des sécrétions ou encore de la barrière intestinale [43], [71], [78], [79] **(*Figure 16)***.

20 types de neurones entériques ont été décrits à partir de leurs caractéristiques morphologiques, neuro-chimiques et fonctionnelles [57], [74]. Les IPANs (Intrinsic Primary Afferent Neurons) sont les neurones sensoriels du système intrinsèque, multi-axonaux ou pseudo-unipolaires, ils représentent 10 à 30% des neurones des plexi. Majoritairement présents dans l'intestin grêle et le côlon, ils assurent l'initiation des réflexes de motilité et de sécrétion en détectant l'état physique de l'intestin et le contenu chimique de la lumière intestinale. Ils font des synapses entre eux, avec les interneurones et avec les motoneurones directement [57], [74], [79], [80]. Les motoneurones qui possèdent le plus souvent leur corps cellulaire au niveau du plexus myentérique ont un axone unique. Il en existe 5 types : les excitateurs et les inhibiteurs

qui innervent les muscles lisses et la muscularis mucosae, les sécréto-moteurs/vasodilatateurs, les sécréto-moteurs et ceux qui innervent les cellules entéro-endocrines [57], [74], [80]. Les interneurones ascendants (vers la cavité buccale) et descendants (vers la cavité anale), permettent, eux, de contrôler et de coordonner l'activité des motoneurones [73], [80]. Enfin, les IFANs (intestinofugal neurons), dont le corps cellulaire est dans l'intestin, projettent au niveau des ganglions prévertébraux. Ils permettent la survenue de réflexes entéro-entériques qui évitent le SNC [19], [73] ***(Figure 16)***.

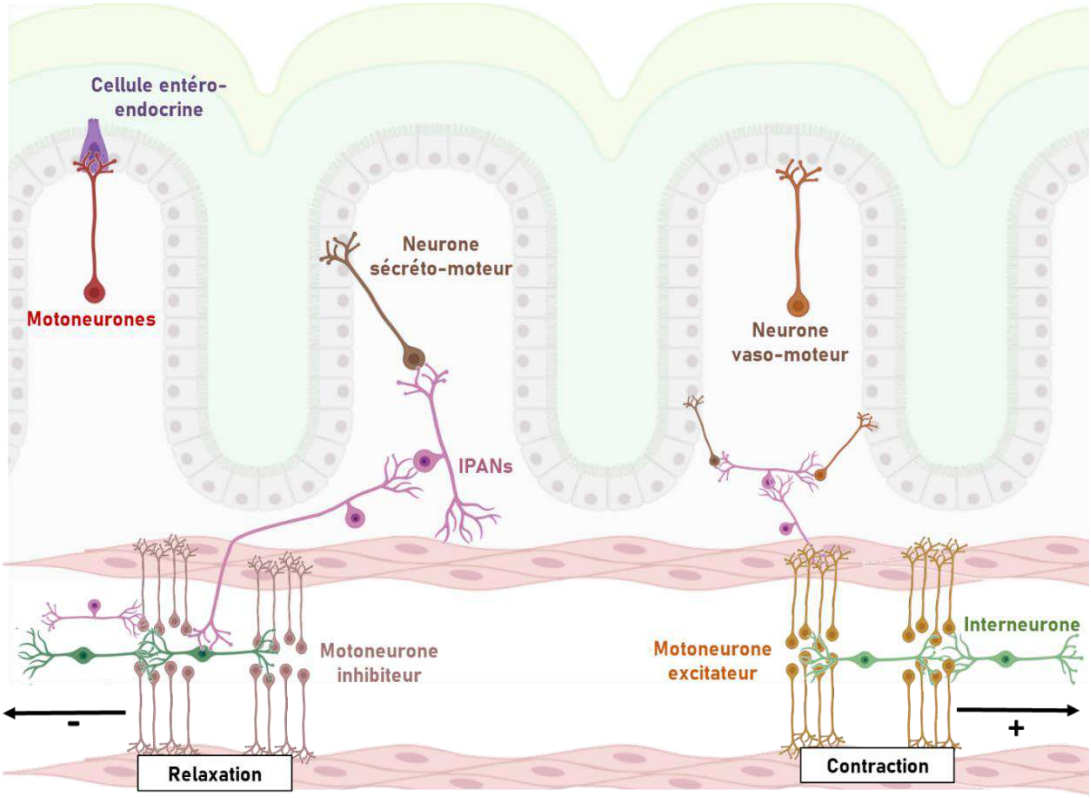


Figure 16 : Le système nerveux entérique intrinsèque

C. Le système nerveux entérique extrinsèque

Etroitement lié au système nerveux central, l'intestin possède trois voies de communication à la fois afférentes et efférentes avec le SNC : l'innervation vagale, l'innervation spinale thoraco-lombaire et l'innervation spinale lombosacrée ou pelvienne [73], [80]. Ces trois types d'innervation s'établissent précocement dans le développement embryonnaire, entre la 5ème et la 9,5ème semaine chez l'humain [81], [82].

Le nerf vague est un nerf mixte, c'est-à-dire qui possède à la fois des afférences et des efférences. Composé de 40 à 50 mille axones, il innerve majoritairement la partie haute du tractus digestif [73], [78], [80]. Sa mise en place embryonnaire débute au niveau du côlon le 16,5^{ème} jour de développement chez la souris par la mise en place des afférences puis des efférences [75], [82]. L'innervation spinale connecte la moelle épinière à l'intestin via des afférences et l'intestin à la moelle épinière via des efférences sympathiques. Ses afférences se mettent en place entre le 12ème et le 16ème jour de développement embryonnaire chez l'humain, et à partir du 15ème jour chez la souris [82]. Le nerf pelvien via le plexus sacré apporte également des afférences et des efférences sympathiques et parasympathiques au niveau du côlon.

1. L'innervation extrinsèque afférente

Responsables de la régulation de l'appétit, de la satiété, de la motilité et des sécrétions, les afférences vagales peuvent être mécano-réceptrices, chémoréceptrices ou tensio-réceptrices. Elles prennent leur source au niveau des ganglions inférieurs du nerf vague (nodose et ganglion jugulaire inférieur) et projettent au niveau du noyau du tractus solitaire dans le tronc cérébral. Peu présentes au niveau du côlon, elles sont sous le contrôle des hormones relarguées par les cellules entéro-endocrines en réponse au contenu luminal [57], [83]. Les neurones afférents des voies spinales thoraco-lombaire possèdent leurs corps cellulaires dans les ganglions spinaux dorsaux (GSD) et sont pseudo-unipolaires, c'est-à-dire qu'ils possèdent un axone qui se divise en deux branches. Une branche qui projette au niveau de la lamina propria, des artérioles ou plus rarement au niveau des couches musculaires et l'autre qui projette au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière [57], [80]. Ces fibres, le plus souvent non myélinisées, sont responsables de la transmission des informations douloureuses, d'inconfort et de ballonnement [57]. Les afférences pelviennes transmettent également le message douloureux, leur section abolie la réponse viscéro-motrice lors de la distension colorectale [74] ***(Figure 17)***. Au niveau de l'intestin, ces afférences extrinsèques se connectent au niveau des ganglions du plexus myentérique, de la muqueuse le long des villosités puis se ramifient sous la couche épithéliale, au niveau des musculeuses circulaire et longitudinale et dans lamina propria.

2. L'innervation extrinsèque efférente

a) L'innervation orthosympathique

Le système orthosympathique est responsable d'une diminution de la motricité et des sécrétions intestinales. Les voies efférentes thoraco-lombaires contrôlent le tonus vasculaire et les fonctions contractiles et sécrétrices de l'intestin. Les corps cellulaires des neurones qui les composent sont contenus dans les colonnes inter médio-latérales de la moelle épinière (L2-L5 pour le côlon), gagnent la chaîne sympathique et forment une synapse dans les ganglions prévertébraux. Les neurones innervant l'intestin grêle projettent dans le ganglion mésentérique supérieur et ceux innervant le côlon dans le ganglion mésentérique inférieur. Les neurones provenant de ces ganglions projettent au niveau de 4 cibles primaires : les plexis sous-muqueux et myentériques, les vaisseaux sanguins et les sphincters [57], [80]. Les efférences pelviennes (L6-S2) et sacrées (S2-S4), appartiennent au système nerveux sympathique et projettent dans le côlon au niveau des plexis du système nerveux entérique intrinsèque, soit directement, soit via un relais au niveau des ganglions prévertébraux et pelviens. Le centre de la défécation situé dans la moelle épinière au niveau lombo-sacré contrôle la motilité du côlon et du rectum. C'est une innervation somatique, responsable du contrôle des sphincters et de la défécation [57] ***(Figure 17)*.**

b) L'innervation parasympathique

Le système parasympathique a plutôt des effets activateurs sur les fonctions intestinales. Les voies nerveuses parasympathiques sont vagales et pelviennes. Les efférences vagales proviennent du noyau moteur dorsal du nerf vague, pour les parties basses du TD, et du noyau ambigu, pour les parties hautes. Ces efférences parasympathiques contiennent des neurones pré-entériques qui vont former des synapses avec le système nerveux entérique intrinsèque et participent au contrôle de la motricité intestinale [57]. Les efférences pelviennes apportent une innervation au côlon et au rectum directement ou indirectement via des relais dans les ganglions pelviens [74] **(*Figure 17)***.

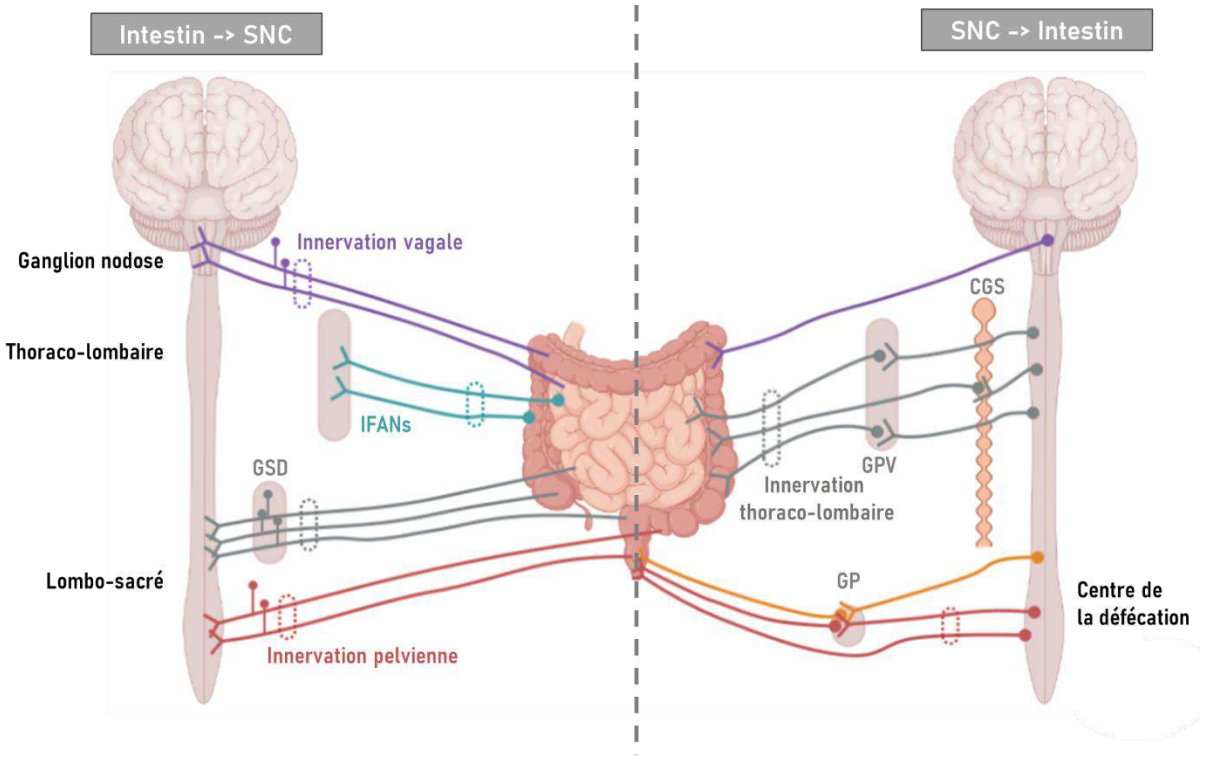


Figure 17 : Le système nerveux entérique extrinsèque

Adaptée de Furness et al. 2009

(GP = ganglion pelvien, GPV = ganglion prévertébraux, GSD = ganglion spino-dorsaux, CGS = chaîne des ganglions sympathiques)

VI. La douleur viscérale

A. Définition

La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle associée à un dommage tissulaire réel ou potentiel. C'est toujours une expérience personnelle influencée par des facteurs biologiques, psychologiques et sociaux, dont le ressenti devrait toujours être respecté. Bien que la douleur serve un but adaptatif, elle a également des effets délétères sur le bien-être fonctionnel, social et psychologique. Enfin, son expression ne se limite pas à la seule description verbale (IASP, 2017). La nociception est le processus neuronal d'intégration des stimuli nocifs dont les conséquences peuvent être autonomiques (ex : pression sanguine élevée) ou comportementales (ex : reflexe moteur de retrait). Elle n'est pas toujours associée à de la douleur (IASP).

B. Généralités

Longtemps considérée comme un châtiment de Dieu, la valeur rédemptrice de la douleur disparait avec Hippocrate (460-377 avant J-C) et le développement de la pharmacopée analgésique. Plus tard, Galien (129-201) démontre le rôle conducteur des nerfs et attribue à la douleur une fonction de localisation de la lésion. Au moyen-âge, en Occident, le retour de l'influence religieuse sur la médecine réattribue à la douleur un symbole de fatalité divine. Au XVIIIème siècle, l'intérêt porté à l'impact de la prise en charge de la douleur sur la survie des patients se développe et mène à l'inscription de cette prise en charge dans les droits fondamentaux du patient. De nos jours, la prise en charge de la douleur, bien que plus efficace reste insuffisante et les mécanismes qui en sont à l'origine, notamment au niveau viscéral, sont encore mal compris.

La douleur viscérale est perçue comme diffuse, difficile à caractériser et peut être attribuée à tort à d'autres structures [83], [84]. Elle est accompagnée de symptômes autonomiques (pâleur de la peau, une transpiration abondante, de la nausée, des perturbations gastriques, etc.) et d'une réponse émotionnelle importante [84], [85]. Cette dernière est causée par le chevauchement des circuits neuronaux impliqués dans la douleur viscérale et ceux du système nerveux autonome impliqué dans les réponses émotionnelles [85]. Ces différentes caractéristiques rendent difficile l'établissement d'un diagnostic précis et la prise en charge efficace de la douleur viscérale. En effet, les antidouleurs utilisés en pratique ont souvent une efficacité limitée et des effets secondaires indésirables intestinaux, ce qui amplifie le mal-être des patients [86]. La douleur viscérale émane des organes internes creux qui sont en contact avec l'extérieur, et peut être la conséquence d'une maladie ou d'une atteinte physique de l'organe, elle sera alors qualifiée de douleur viscérale organique (douleur viscérale secondaire dans la classification internationale des maladies (ICD-11)). Elle peut aussi être classée comme douleur viscérale fonctionnelle ou nociplastique (douleur viscérale primaire (ICD-11)) lorsqu'elle découle d'une altération de la nociception périphérique ou centrale [83]–[85]. De plus, la douleur viscérale peut être classée en fonction de sa durée, aigüe ou chronique lorsqu'elle dure plus de 3 mois [84]. Ce paragraphe ne portera que sur la douleur fonctionnelle chronique.

La douleur viscérale fonctionnelle chronique est une des caractéristiques de nombreuses maladies telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII) ou la dyspepsie fonctionnelle.

Différentes altérations peuvent entraîner sa mise en place : une augmentation des signaux afférents, une sensibilisation du SNC, une altération des voies descendantes et une sensibilisation et/ou réorganisation des centres cérébraux impliqués dans les processus de douleur. En revanche, elle n'est pas due à la présence de dommages tissulaires identifiables au niveau intestinal ou nerveux [85], [87]. Ces altérations se manifestent soit par une allodynie (sensation douloureuse à un stimulus qui ne l'est pas normalement), soit par une hyperalgésie (sensation douloureuse accentuée à un stimulus douloureux) [84]. Seuls les mécanismes impliqués dans la douleur du côlon seront décrits dans ce paragraphe. Peu sensible aux variations de température, le côlon est en contact permanent avec les différentes molécules apportées par l'alimentation et le microbiote intestinal, ce qui le rend également peu sensible aux agents chimiques responsables de douleurs somatiques. En revanche, il est sensible au stress mécanique, particulièrement à la distension, mais peu aux coupures, pincements, et déchirures [85].

C. Les voies afférentes de la douleur viscérale ou nocicepteurs

L'innervation sensitive de l'intestin est médiée par les afférences spinales thoraco-lombaires (TL) projetant via le nerf splanchnique et les afférences lombo-sacrées (LS) projetant via le nerf pelvien [83], [84], [88]–[90]. Ces fibres afférentes sont composées d'une population de neurones divers, généralement classée selon le type de stimuli auxquels elles répondent (étirement, pression, effleurement), les 5 types majeurs de terminaison (muqueuses, intra-ganglioniques, musculo-muqueuses, intramusculaires, et vasculaires) ou selon leurs caractéristiques moléculaires (peptidergiques ou exprimant des canaux sodium dépendants Nav1.8) [88]. En 2018, *Hockley et al.* [91] proposent une nouvelle classification basée sur le séquençage ARN single cell dans laquelle ils décrivent sept populations de neurones chez la souris, toutes

associées à un marqueur spécifique **(*Figure 18)***. Cinq de ces populations sont communes aux voies TL et LS, et les deux restantes sont restreintes à la voie LS.

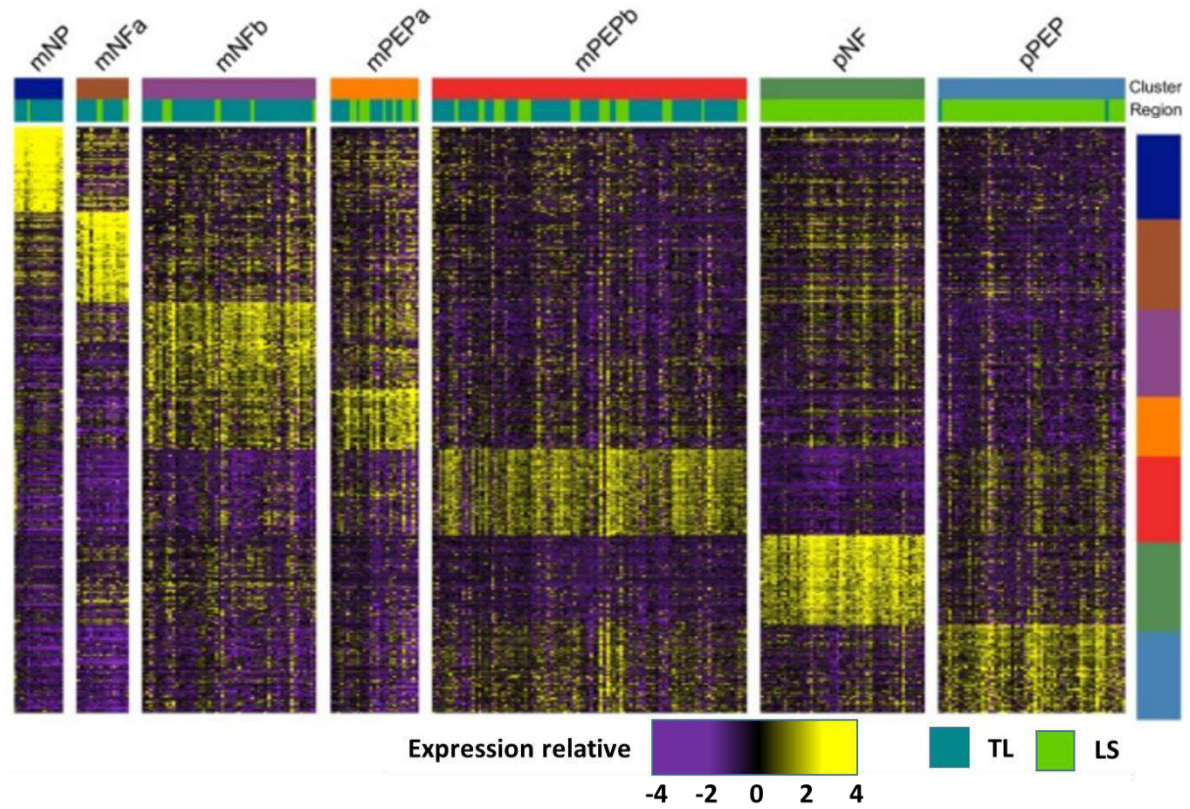


Figure 18 : Heatmap des 100 gènes les plus exprimés dans les sept sous-populations en séquençage ARN single cell.

Adaptée de Hockley et al. 2018 [91]

Heatmap de l'expression des 100 gènes les plus exprimés pour chaque sous-type de neurones sensitifs parmi les 709 marqueurs identifiés par single cell RNAseq.

TL = Thoraco-lombaire, LS = Lombo-sacré.

1. Les populations mixtes

Les deux premières populations mixtes mNFa (mNeuroFilament a) et mNFb (m NeuroFilament b) sont caractérisées par l'expression de gènes typiques des neurones myélinisés des ganglions spino-dorsaux : *Nefh (Neurofilament heavy chain), Ldhb (lactate dehydrogénaseB)* qui permettent, respectivement, la formation des neurofilaments et la conversion du lactate en pyruvate, et de *piezo2* un mécano-transmetteur. mNFa est discriminée par son expression de *Cbln2 (cerebellin 2 precursor protein)* impliquée dans l'organisation des synapses et mNFb par *Fam19a1* (*family with sequence similarity 19, member A1)* une neurokine. La troisième

population, mNP (mNon Peptidergiques) qui correspond aux nocicepteurs non peptidergiques, est caractérisée par la présence de *P2rx3 (purinergic receptor P2X3), Piezo2* et *Mrgprd (MAS-related GPR member D)* qui est son marqueur exclusif.

Enfin, les deux dernières populations, mPEPa (mPeptidergic-a) et mPEPb (mPeptidergic-b), sont les populations distinguées par l'expression de récepteurs peptidergiques comme le récepteur à la CGRP (Calcitonine Gene-Related Peptide, *Calca*) ou à la substance P (*Tac1)*. La sous-population « a » exprime spécifiquement *Trpv4 (Transient Receptor Vanilloid 4), Tlr4 (Toll-like Receptor 4) et Smr2 (submaxillary gland androgen regulated protein 2)* son marqueur. La population « b » est marquée par la présence des canaux calciques *Trpv1 (Transient Receptor Vanilloid 1), Trpv4 (Transient Receptor Vanilloid 4) et Trpa1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1)* son marqueur **(Fi*gure 19)*** [91].

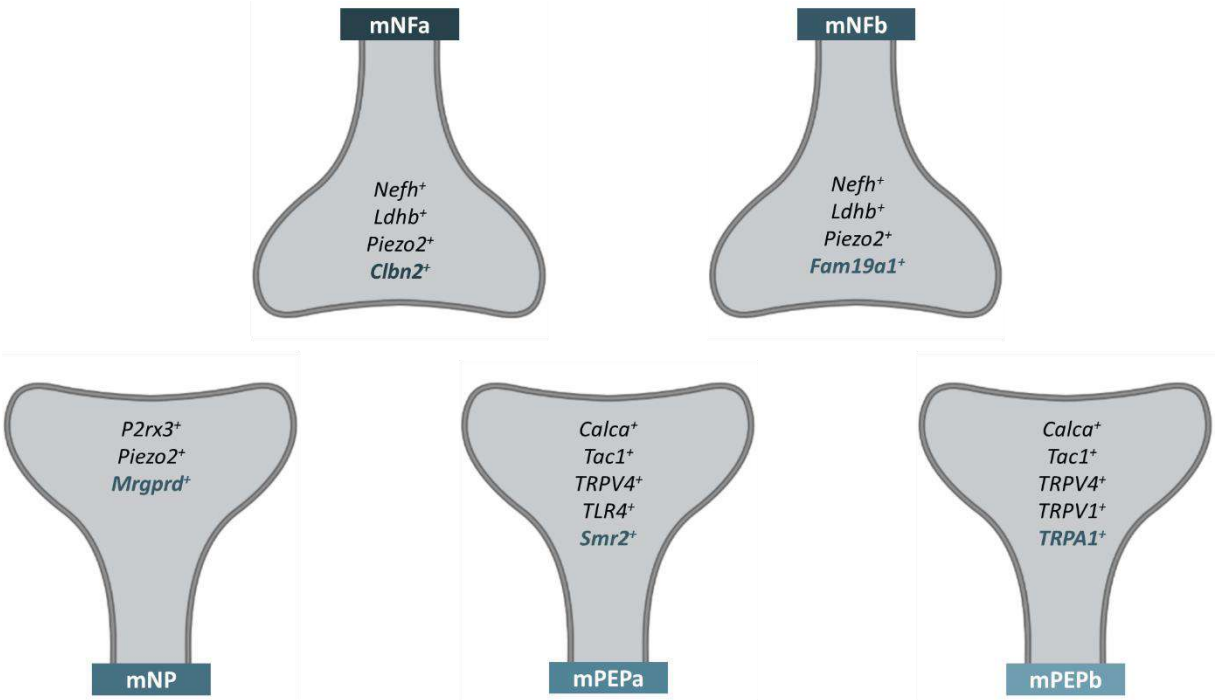


Figure 19 : Les cinq populations mixtes d'afférences sensitives du côlon

2. Les populations lombo-sacrées

Les populations exclusives au segment LS sont les populations pNF et pPEP. pNF exprime les mêmes marqueurs que la population mNF plus son marqueur l'heparanase *(Hpse)*. pPEP est peptidergique et exprime les mêmes récepteurs que mPEPa et mPEPb, mais diffère par l'absence

de *TRPA1*, sa forte expression de la tyrosine hydroxylase (*Th)* et de son marqueur, la neurotrimine *(Ntm)* une protéine qui promeut la croissance des prolongements axonaux. Les corps cellulaires de cette population sont les plus petits des sept identifiés ***(Figure 20)*** [91]**.** L'expression de multiples mécanorécepteurs, par exemple dans une même population ou d'un même mécanorécepteur dans plusieurs populations montrent qu'il est difficile de classer correctement les fibres de différentes populations en fonction de leurs réponses à différents stimuli [88], [91].

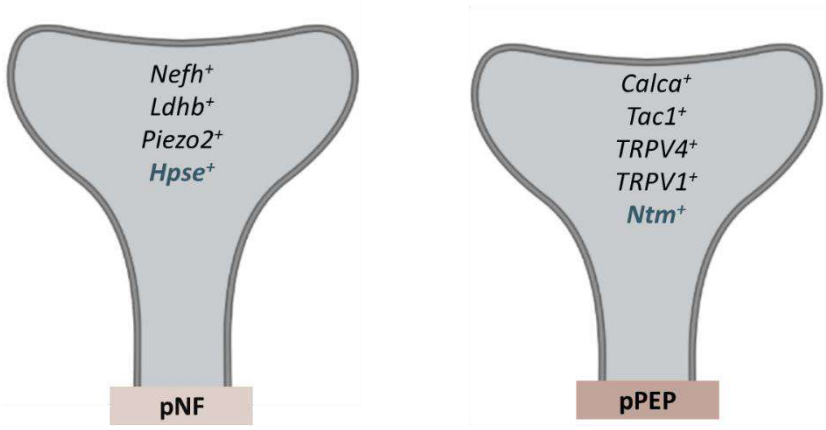


Figure 20 : Les deux populations exclusivement pelviennes des afférences sensitives du côlon

D. Les récepteurs majeurs de la douleur viscérale

Pour détecter les différents signaux nociceptifs qu'elles devront ensuite intégrer et transmettre au SNC, les afférences nociceptives possèdent plusieurs types de récepteurs. Ces récepteurs sont répartis en deux classes : les récepteurs canaux et les récepteurs couplés à une protéine G (RCPG) **(*Figure 21)***.

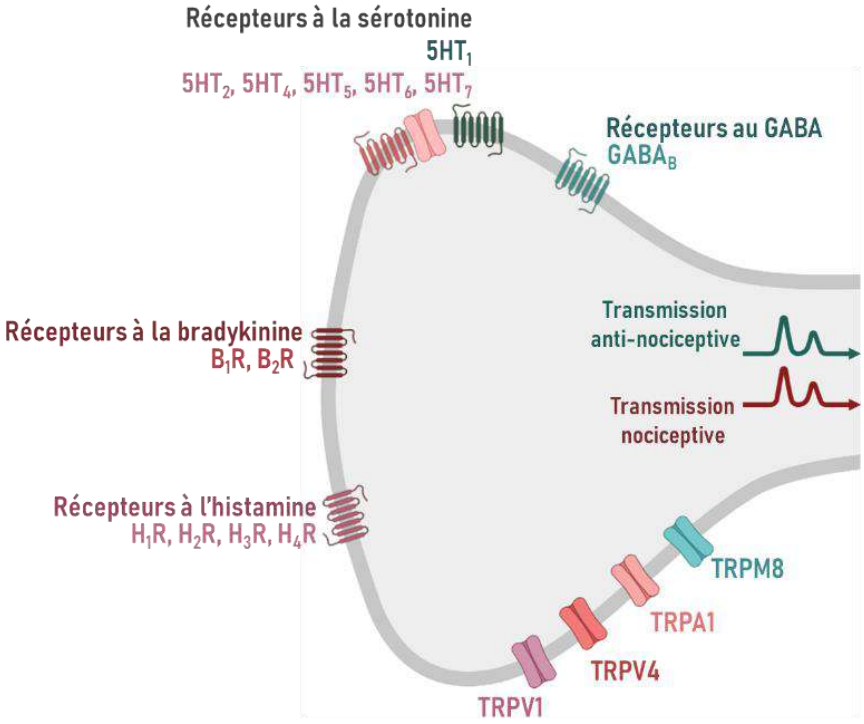


Figure 21 : Les récepteurs impliqués dans la douleur viscérale

1. Les récepteurs canaux

Les récepteurs canaux les plus étudiés dans la douleur viscérale, appartiennent à la famille des TRPs (Transient Receptor Potential). 6 sous-familles différentes ont été décrites chez les mammifères : TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP et TRPA, mais seulement les TRPV, TRPM et TRPA sont décrits dans la détection du message douloureux. L'activation de ces récepteurs canaux dépolarise la membrane plasmique permettant l'ouverture de canaux ioniques voltage dépendant. Une augmentation de cations (Na^+ et Ca^{2+}) qui découle de cette ouverture va permettre la propagation du signal sous forme de potentiel d'action et donc du message nociceptif **(*Figure 22)***.

a) TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1)

TRPV1 est le TRP le plus étudié dans le contexte de la douleur viscérale. Exprimé par les neurones sensitifs extrinsèques (82% des afférences thoraco-lombaire et 50% des afférences lombo-sacrées) et intrinsèques, il est souvent co-exprimé avec TRPA1. TRPV1 est activé par les températures nocives supérieures à 42°C, un pH faible (inférieur à 6,5), la capsaïcine qui est son agoniste exogène de référence, et certaines molécules lipidiques endogènes : 5-HETE (Acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque), 15-HETE (Acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque), LTB4 (Leukotriène B4) et l'anandamide. L'activation du récepteur peut être modulée par d'autres molécules. Elle

peut être sensibilisé via l'activation par la sérotonine, l'histamine et la bradykinine de leur récepteurs respectifs. Son activation peut également être désensibilisée par RVD_1 (Résolvine D1), RVD_2 (Résolvine D2) et RVE_1 (Résolvine E1) *in vitro* et RVD_2 *in vivo* via une signalisation RCPG dans un modèle d'hypersensibilité viscérale chez le rat [83], [92]–[95] **(*Figure 22)***.

b) TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4)

Exprimé à la fois sur les fibres afférentes extrinsèques, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, sa délétion chez des souris KO diminue la sensibilité aux fortes pressions de distensions colorectales. TRPV4 est activé par les températures supérieures à 27°C, l'acidité et certaines molécules lipidiques comme l'anandamide, le 5,6-EET (acide 5,6-epoxy-eicosatrienoique), et le 8,9-EET (acide 8,9-epoxy-eicosatrienoique) [93], [94] **(*Figure 22)***.

c) TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1)

Seul membre de sa famille identifié chez les mammifères, il est activé par les températures nocives inférieures à 17°C et une large variété de molécules comme l'AITC (son agoniste synthétique de référence), le $8isoPGA_2$ (8-iso Prostaglandine A2) et le 15dPGJ2 (*15*-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2) qui sont des prostaglandines. TRPA1 est lui aussi exprimé à la fois sur les afférences extrinsèques et les neurones intrinsèques [93]–[95] **(*Figure 22)***.

d) TRPM8 (Transient Receptor Potential Melastatin 8)

Très exprimé dans les neurones provenant des GSD au niveau thoraco-lombaire et lombo-sacré, il est activé par les températures comprises entre 10 et 23°C. L'acide arachidonique, l'acide eicosapentaénoïque, l'acide docosahexaénoïque (acides gras polyinsaturés) sont des antagonistes de TRPM8. Contrairement aux récepteurs-canaux décrits précédemment, TRPM8 aurait une activité anti-nociceptive [94], [95] **(*Figure 22)***.

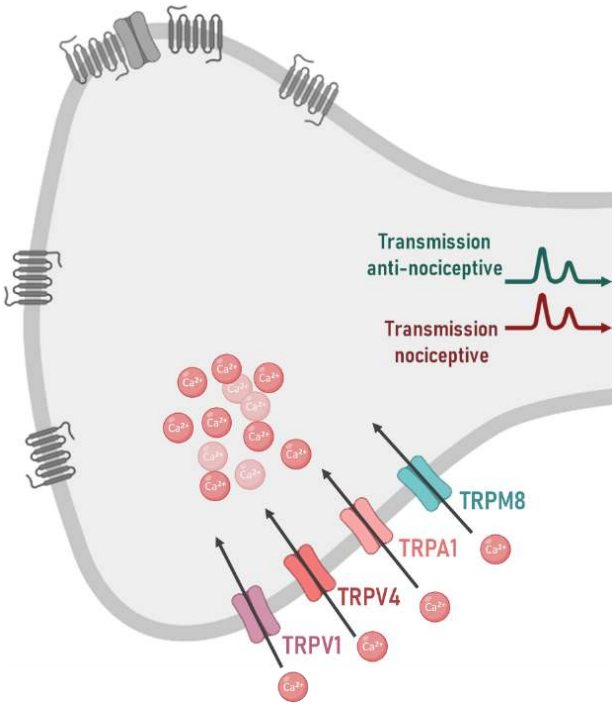


Figure 22 : Les canaux calciques

2. Les Récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

Ces récepteurs sont situés à la surface des neurones afférents primaires et modulent le message douloureux.

a) Les récepteurs à la bradykinine

La bradykinine (BK), est une kinine endogène à courte durée de vie, vasoactive, qui possède un rôle dans les processus inflammatoires et nociceptifs. La BK possède deux récepteurs B1R et B2R. B2R est exprimé constitutivement et est internalisé lors de l'activation par la BK. B1R, lui a une expression inductible et n'est pas internalisé, son activation participe donc à la persistance de la douleur chronique. Ces deux récepteurs sont couplés à une protéine $G_{\alpha q}$, qui induit, via la production de DAG et d'IP3, la sortie du Ca^{2+} endoplasmique et la phosphorylation et donc la sensibilisation de TRPV1 [96]–[98] **(*Figure 23)***.

b) Les récepteurs à l'histamine

Découverte en 1910, l'histamine appartient à la famille des amines biogènes et participe à l'inflammation, la neurotransmission et la vasodilatation. L'histamine possède 4 récepteurs. H1R et H2R, qui ont une faible affinité pour l'histamine, sont couplés à une protéine $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha s}$, respectivement, qui vont induire la sensibilisation de TRPV1 et TRPV4 et amplifier le signal douloureux. H3R et H4R ont une plus forte affinité pour l'histamine et sont liés à une protéine $G_{\alpha i}$, ce qui va engendrer une diminution de l'AMPc cytosolique et une diminution de l'excitabilité du neurone [96]–[98] **(*Figure 23)***.

c) Les récepteurs à la sérotonine

Produite en grande quantité par les cellules entérochromaffines de l'épithélium intestinal, la sérotonine est impliquée dans une multitude de processus tels que la motilité intestinale, la prise alimentaire, le cycle veille/sommeil mais aussi la nociception. Elle possède 7 récepteurs : 6 sont couplés à une protéine G et un est un canal ionique. Seulement 4 d'entre eux sont impliqués dans la nociception. 5-HT2 qui est lié à une protéine $G_{\alpha q}$ et 5-HT7 qui est lié à une protéine $G_{\alpha s}$ vont sensibiliser les TRPs. 5-HT3 qui est un canal ionique excite les neurones directement via l'entrée de Na^+. Enfin, le 5-HT1 qui est lié à une protéine $G_{\alpha i}$ diminue le message douloureux [96]–[98] **(*Figure 23)***.

d) Les récepteurs au GABA

Le GABA est un des neurotransmetteurs inhibiteurs majeurs dans plusieurs processus. Il possède comme récepteurs deux canaux ionotropiques : GABAA et GABAC et un récepteur couplé aux protéines G : GABAB. Les canaux GABAA et GABAC sont exprimés au niveau du SNP et du SNC où ils sont impliqués dans la réduction de l'anxiété. GABAB est composé de 2 sous-unités : GABAB1 et GABAB2 dont l'activation entraîne le recrutement d'une protéine $G_{\alpha i}$ entrainant la fermeture des canaux Ca^{2+} voltage dépendant (Cav2.1 et Cav2.2) et l'ouverture des canaux potassiques. Il va en découler une hyperpolarisation membranaire et une inhibition de l'AC et donc de la sécrétion des neurotransmetteurs excitateurs. Cette voie de signalisation permet la diminution de la transmission nociceptive [96]–[98] **(*Figure 23)***.

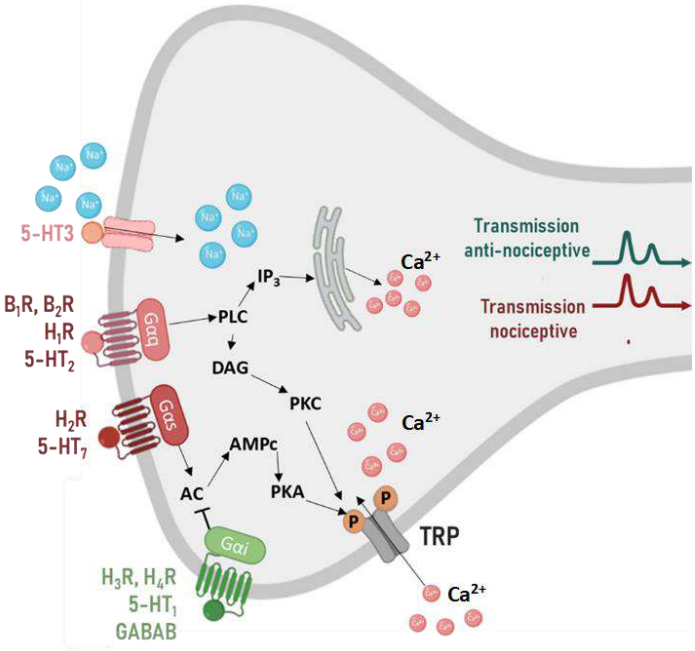


Figure 23 : Les récepteurs couplés à des protéines G

Ces récepteurs permettent la reconnaissance de métabolites produits par l'hôte, provenant de l'alimentation ou du microbiote intestinal. Par son implication dans toutes les grandes fonctions de l'intestin, le microbiote intestinal représente un partenaire important de la physiopathologie intestinale. Cette communauté de micro-organismes, formant un organe supplémentaire pour l'hôte, se développe en parallèle de l'intestin et peut être impactée par des facteurs environnementaux.

Chapitre 2 : Le microbiote intestinal

I. Généralités

A. Généralités & définitions

Le terme de microbiote intestinal, défini en 1927, regroupe les différents micro-organismes (bactéries, archées, virus, eucaryotes) ayant comme habitat le tractus digestif. Différents organes comme la peau, le système uro-génital ou pulmonaire possèdent un microbiote, mais c'est au niveau de l'intestin qu'il est le plus dense et le plus étudié. Depuis sa première description en 1681 par Antonie van Leeuwenhoek lorsqu'il observa au microscope plus de 1000 « animalcules » dans ses fèces, les preuves d'un rôle indispensable du microbiote pour la santé de l'hôte se sont accumulées [99] **(*Figure 24)***.

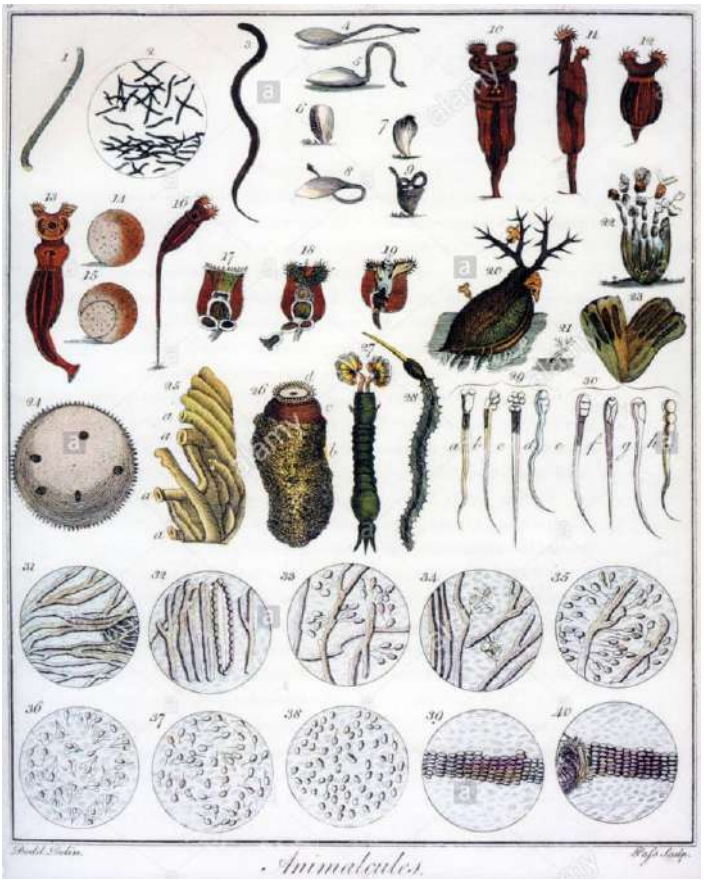


Figure 24 : Représentation des animalcules par A. van Leeuwenhoek

Localement, le microbiote intestinal participe au maintien de l'homéostasie intestinale en participant à la fonction de barrière, à l'extraction des nutriments de l'alimentation et à la conjugaison des acides biliaires, par exemple. Sa contribution ne se limite pas à la sphère intestinale et influence, entre autres, le système immunitaire ou le comportement [100]–[104]. En plus de son rôle homéostasique, les changements de composition des populations de micro-organismes qui le composent, appelés dysbiose, sont impliqués dans l'établissement et la chronicité de différentes pathologies comme le cancer colorectal, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le syndrome de l'intestin irritable (SII), la dépression ou les maladies cardio-vasculaires [36], [100], [101], [104].

B. Composition, organisation et fonctions du microbiote

Les bactéries sont les micro-organismes du microbiote intestinal les plus étudiées, et les estimations les plus récentes portent leur masse à 200 g [105], [106]. Chez l'humain environ 3.10^{13} bactéries résident dans le TD, soit autant que de cellules humaines. Elles apportent à l'hôte 2 à 20 millions de gènes, dont la majorité possèdent des fonctions non redondantes [100], [106]. D'un point de vue taxonomique, le microbiote intestinal est composé de 60 genres provenant majoritairement des phyla *Firmicutes* (60 à 80%), *Bacteroidetes* (15 à 30%), *Actinobacteria* (2 à 10%) et *Protéobactéries* (2%) [105]–[107].

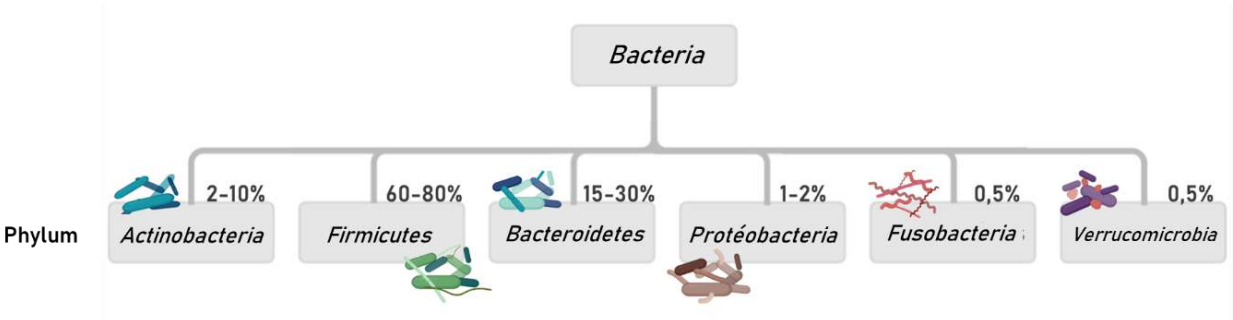


Figure 25 : Les phyla composant le microbiote intestinal

Ces phyla sont répartis différentiellement le long du TD en suivant deux gradients, un longitudinal et un transversal, qui reflètent les variations de fonction des différents segments du TD. Longitudinalement, dans un axe oro-anal, la biogéographie du microbiote s'établit selon les gradients décroissants d'oxygène et de temps de transit, et croissants de pH et de bactéries

(*Figure 26)*. Ainsi, l'intestin grêle, dans lequel 10^8 bactéries sont présentes, est propice à l'établissement de populations d'anaérobies facultatives, adhérentes au mucus. Le côlon, qui contient 10^{14} bactéries, favorise les espèces anaérobies utilisant les carbohydrates non digérés dans la partie haute du TD [36], [106], [108]–[110] ***(Figure 26)***.

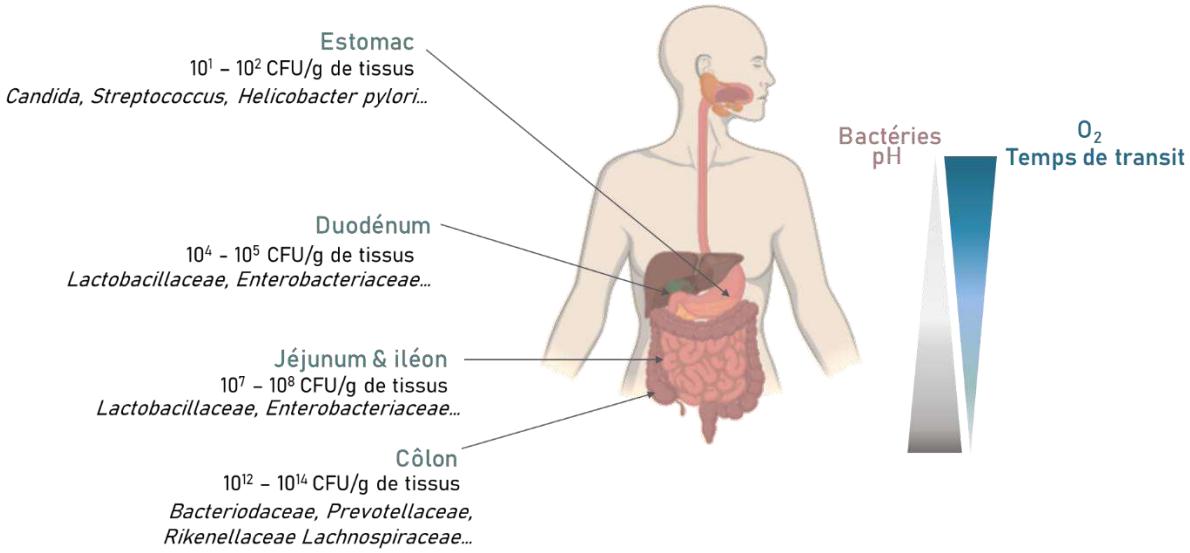


Figure 26 : Le gradient longitudinal

Transversalement, de la surface de la muqueuse intestinale vers la lumière du TD, les variations de taille et de composition de la couche de mucus régulent également la composition bactérienne. Le mucus apporte des substrats que seules certaines espèces bactériennes, comme *Akkermansia Muciniphila,* sont capables d'utiliser [36], [106], [108], [110]. Le microbiote s'organise en biofilm, une communauté bactérienne complexe ancrée dans une matrice de polymères sécrétés par l'hôte et le microbiote [111].Ceci lui apporte une structure avantageuse qui le protège des stress environnementaux et améliore les échanges avec l'hôte [100].

La composition du microbiote intestinal varie également en fonction des espèces. Les modèles murins sont largement utilisés en recherche mais les différences de taxonomie avec l'humain ne permettent pas toujours de transférer les données acquises en préclinique à la clinique [112]. Au niveau des phyla, les deux microbiotes sont similaires à 90% et se ressemblent par la domination des *Firmicutes* (Gram $^+$) et des *Bacteroidetes* (Gram $^-$) qui représentent, respectivement, 60 à 80% et 15 à 30% des bactéries totales. Bien qu'environ 80 genres bactériens

sont communs entre les deux, les différences se retrouvent au niveau des espèces. Chez l'humain, le microbiote du côlon est dominé par les genres *Fecalibacterium*, *Roseburia*, et *Bifidobacterium,* alors que chez la souris les genres *Lactobacillus, Turicibacter et Allistipes* sont majoritaires [101], [112], [113] ***(Figure 27)***.

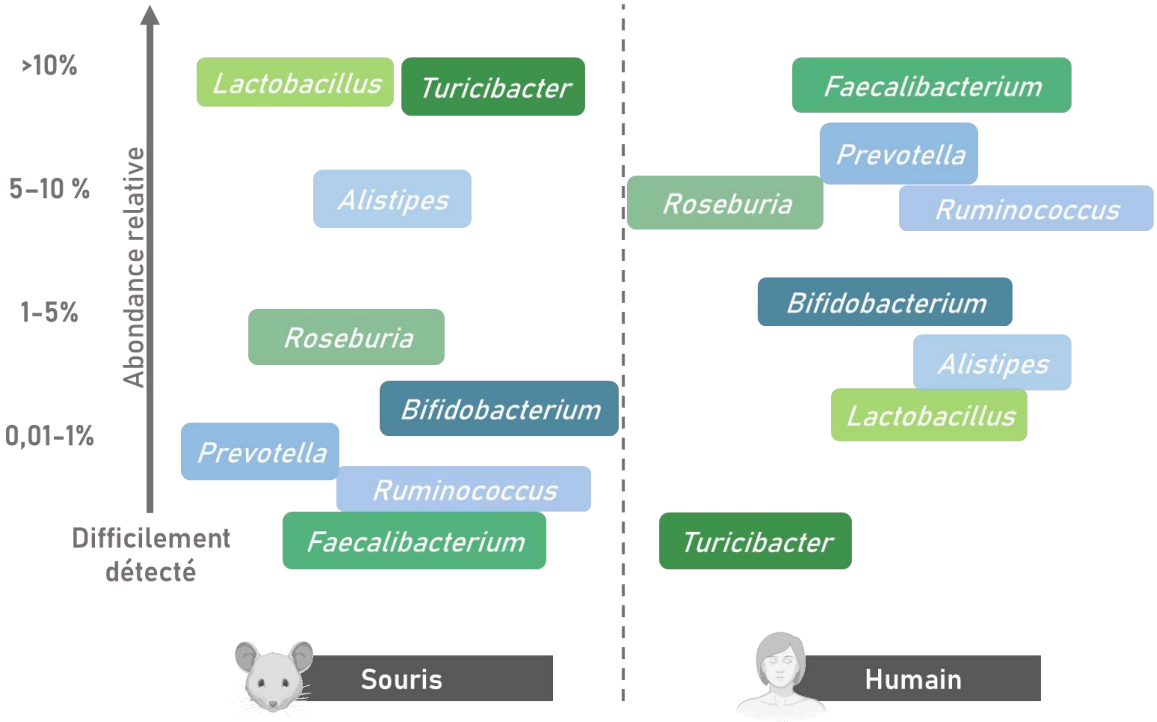


Figure 27 : Composition des microbiotes murin et humain

Adaptée de NGuyen et al. 2015 [101]

Malgré ces différences, les fonctions remplies par la flore intestinale restent similaires et sont essentielles au développement et la maturation de l'hôte. La première fonction importante, remplie par les bactéries commensales, est métabolique. En effet, elles participent à la fermentation des carbohydrates non digérés dans l'intestin grêle pour les transformer en acides gras à courte chaîne (AGCC) qui sont une source considérable de nutriment pour les cellules épithéliales intestinales. Les souris axéniques (dépourvues de microbiote) doivent compenser cette perte énergétique en augmentant leur prise alimentaire [114], [115]. Les AGCCs produits majoritairement par les *phyla Bacteroides, Roseburia, Bifidobacterium, Fecalibacterium, et Enterobacteria* seront décrits plus en détail dans le troisième chapitre de ce manuscrit. Les

Bacteroides thetaiotamicron participent eux à l'hydrolyse des lipides de la lumière intestinale en sécrétant une colipase nécessaire à l'activité de la lipase pancréatique [114] **(*Figure 28)***. Le microbiote intestinal est également une source de vitamines essentielles pour notre organisme, les vitamines K et B12 [114]. La seconde fonction à laquelle participe le microbiote est le métabolisme des xénobiotiques et des composés aromatiques [109], [114]. Par exemple, la sulfasalazine, indiquée dans la recto-colite hémorragique, est composée de deux molécules, le 5-ASA (5-aminosalicylic acid) conjugué à la sulfapyridine, inactifs sous cette forme. C'est leur métabolisation par le microbiote intestinal qui permet la libération du 5-ASA sous sa forme active [116]. Les cryptes intestinales des souris axéniques sont moins profondes et le mucus moins épais, les bactéries du microbiote intestinal participent donc également à la maturation du TD permettant l'établissement d'une barrière intestinale fonctionnelle. D'autres mécanismes, directs ou indirects, des bactéries commensales protègent l'hôte contre les pathogènes [117]. Par exemple, la production d'acide lactique, par certaines bactéries comme les *Lactobacillus,* diminue le pH du milieu environnent créant ainsi un environnement défavorable à la survie des pathogènes. D'autres bactéries ont un effet indirect sur la fonction de barrière en augmentant la production locale d'IgA sécrétées, en permettant la formation de GALTs fonctionnels et matures ou en participant au développement des T régulateurs [114], [118]. Ce rôle majeur du microbiote dans l'immunologie des muqueuses est illustré par la présence chez les souris axéniques d'un système immunitaire immature avec un nombre inférieur de cellules immunitaires présentes dans la lamina propria et des nœuds lymphatiques plus petits et moins fonctionnels [117] **(*Figure 28)***.

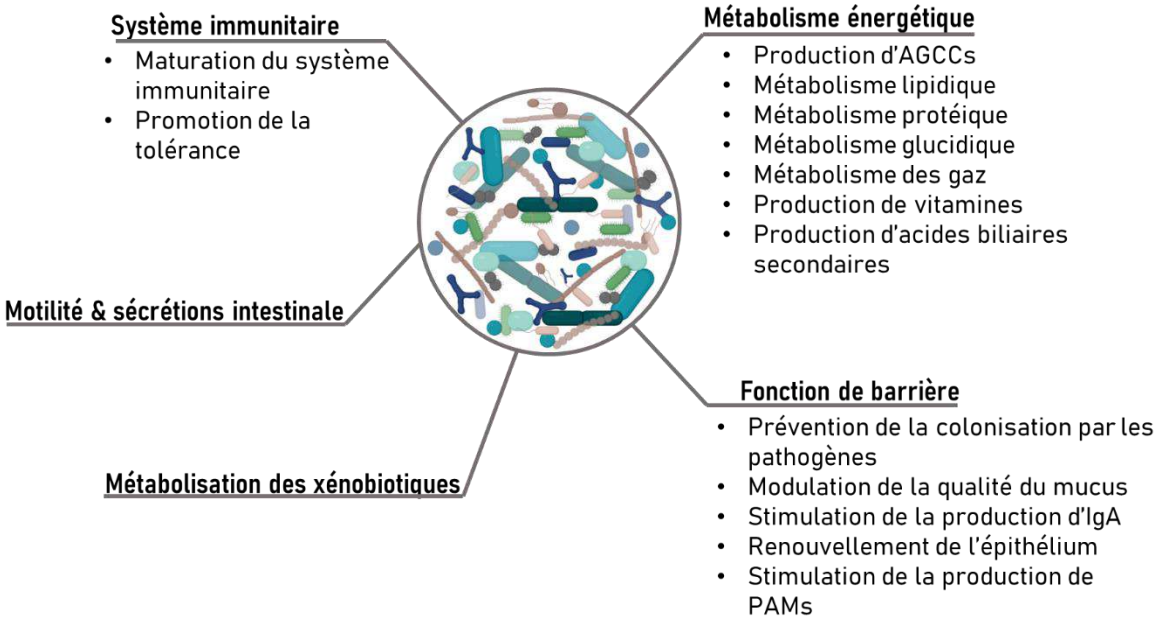


Figure 28 : Les fonctions du microbiote

II. La mise en place du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal se met en place pendant les 3 premières années de la vie puis reste relativement stable. Sa mise en place est impactée à la fois par la génétique de l'hôte mais aussi par l'environnement. Quatre phases distinctes ont été définies dans la mise en place du microbiote. La première phase correspond à la transmission verticale de la mère à l'enfant pendant l'accouchement. Les suivantes, comprenant l'allaitement exclusif, le sevrage et la période post-sevrage, sont des périodes de transmission horizontale, c'est-à-dire de l'environnement à l'individu. Vers l'âge de 3 ans, le microbiote a acquis sa composition adulte et reste relativement stable pour le reste de la vie de l'individu [119]–[122][123]. Cette variation de la composition du microbiote s'accompagne d'une différence fonctionnelle de ce microbiote. Les fonctions remplies par le microbiote suivent sa composition et s'adaptent à l'environnement offert par l'hôte aux différents stades de sa vie. Le microbiote des nourrissons est enrichi en gènes codant pour des enzymes de dégradation des sucres contenus dans le lait et la production des vitamines K2, B6, B7, et B9. Avec le sevrage, les gènes codant pour la dégradation des carbohydrates complexes, la fermentation et la production des vitamines B1, B5 et B12 augmentent [124].

A. La primo-colonisation

In utero, le fœtus est dans un environnement stérile, cependant la barrière placentaire permet le passage de métabolites bactériens qui vont participer au développement de l'enfant [125]. Ces métabolites permettent, par exemple, le bon développement du système nerveux central et du système immunitaire [126], [127]. En 2020, *Kimura et al* [128] ont montré que les AGCCs endogènes ou exogènes marqués par du [^{11}C] traversent la barrière placentaire et sont quantifiables dans le liquide amniotique et les embryons de souris. Le passage des AGCCs dans le liquide amniotique murin a été confirmé en 2021 par Brosseau et al. [129]. De plus, les récepteurs des AGCCs étaient exprimés dans les embryons au niveau des ganglions sympathiques pour GPR41, et de l'intestin et du pancréas pour GPR43, ce qui permet de formuler l'hypothèse que les AGCCs du microbiote maternel peuvent être détectés par le fœtus. L'utilisation de souris délétées pour GPR41 ou GRP43 a montré que la descendance de ces souris présentait moins de projections sympathiques pendant la période embryonnaire et post-natale pour le premier groupe et un retard de différenciation des cellules entéro-endocrines pour le second [128]. *Vuong et al.* [126] ont aussi montré en 2020 que le TMAO (trimethylamine-N-oxide), un métabolite bactérien, module l'axogenèse embryonnaire dans le thalamus et le cortex.

La primo-colonisation des différents microbiotes, et notamment du microbiote intestinal, se déroule à la naissance et diffère entre un accouchement par voie vaginale et par césarienne. Par voie basse, l'enfant est colonisé par les bactéries vaginales et fécales de la mère, représentées, respectivement, par les *Lactobacillus* et par les *Enterobacteriaceae* [130] ***(Figure 29)***. Des *staphylococcus* provenant de la peau sont également retrouvés mais ils sont rapidement supplantés par les bactéries vaginales et fécales. Le microbiote du nouveau-né reste peu diversifié. Les premières espèces colonisatrices sont des bactéries anaérobies facultatives comme les *Escherichia coli* et les *Bifidobacteria* qui, dans les premières 48h, vont créer un environnement favorable à l'établissement de bactéries anaérobies strictes [120]–[122], [117], [130], [131], [107] ***(Figure 29)***. Pendant les jours qui suivent, les bactéries anaérobies strictes se mettent en place. Le microbiote intestinal des enfants nés par voie vaginale est donc conditionné par celui de la mère et reste similaire à celui-ci jusqu'à l'âge de deux ans [119] ***(Figure 29)***. Cette similitude n'est pas toujours retrouvée lors d'un accouchement par césarienne au cours duquel l'enfant est colonisé majoritairement par les bactéries de la peau de sa mère et celles présentes dans l'environnement hospitalier. La colonisation par les *Bifidobacteria, les Bacteroidetes et les*

Lactobacillus est retardée et des différences entre le microbiote maternel et celui de l'enfant persistent pendant plusieurs mois [124], [130], [132]–[134]. Les naissances par césarienne ont été associées à une augmentation du risque, chez l'enfant, de la survenue de pathologies telles que la maladie céliaque, le diabète de type 1 ou l'obésité en lien avec une dysbiose du microbiote [104], [130], [135]–[139]. Cependant, toutes les études ne retrouvent pas de différences significatives entre les enfants nés par voie basse et ceux nés par césarienne. Au-delà des variations inter-cohortes, les méthodes utilisées semblent être un facteur important pour expliquer ces contradictions entre les différentes études [134], [140].

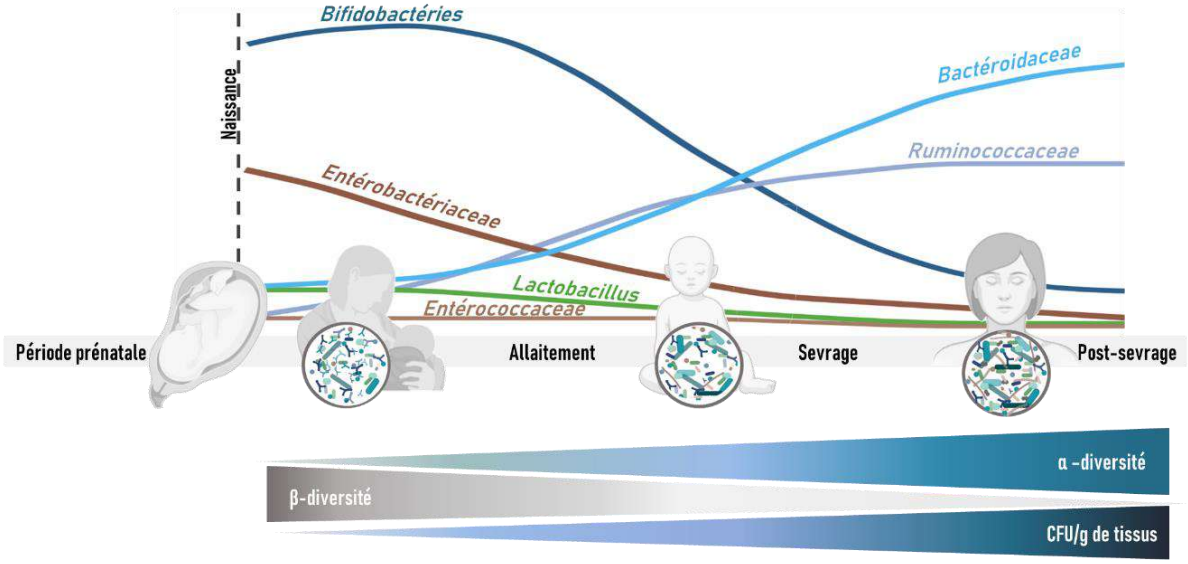


Figure 29 : La mise en place du microbiote intestinal

Adaptée de Laursen et al. 2017 [107]

B. L'allaitement

La seconde période importante dans l'établissement du microbiote intestinal est conditionnée par l'alimentation reçue par le nourrisson. L'allaitement apporte à l'enfant des nutriments (protéines, lipides, vitamines et carbohydrates) et des molécules bioactives essentiels au bon développement intestinal, énergétique et immunitaire [123], [141]. Le lait maternel est une matrice riche qui va fortement impacter la mise en place du microbiote intestinal de l'enfant. Parmi les protéines, la lactoferrine et les IgA ont un effet antibactérien et ces dernières, contenues en grandes quantités dans le lait maternel, régulent les niches bactériennes. Elles favorisent la croissance des *Bacteroides* et diminuent celle de souches inflammatoires comme

les *Enterobacteriaceae* [141]. Les carbohydrates vont aussi avoir un impact sur le microbiote de l'enfant. Le lactose, utilisable par les *Bifidobacteria* et les *Lactobacillus,* n'atteint que très peu l'iléon distal et le côlon et n'en n'impacte donc que très peu le microbiote [141]. A l'inverse, les oligosaccharides du lait humain (HMOs pour Human Milk Oligosaccharides) jouent un rôle majeur dans l'établissement de micro-organismes importants pour la santé. Les HMO sont une famille de 200 molécules différentes qui ne sont pas métabolisées par l'hôte et sont une source énergétique importante pour les *Bifidobacteria et les Bacteroides* [141]. Ces bactéries, dont l'implantation est favorisée par les HMOs, sont également apportées directement par l'allaitement. En effet, le lait maternel contient son propre microbiote dominé par les *Staphylococcus, les Streptococcus, les Bifidobacteria et les Lactobacillus* [104], [124], [141]. ***(Figure 29).*** La composition moléculaire et microbienne du lait peut être impactée par différents facteurs comme l'âge, le poids et l'alimentation de la mère, ou l'exposition aux antibiotiques [104], [141]. Ainsi, les facteurs environnementaux peuvent altérer la mise en place du microbiote à ce stade du développement. Par exemple, en 2021, Cortes-Marcías *et al.* [142] ont étudié le microbiote du lait maternel d'une cohorte humaine et l'ont comparé à l'alimentation des mères. Ils ont associé la présence accrue de *Bifidobacteria* à la consommation de fibres, tandis qu'une consommation élevée de protéines et de lipides était associée à une perte de diversité bactérienne.

L'utilisation de laits industrialisés, qui ne reproduisent pas la complexité métabolique du lait maternel, entraîne chez le nourrisson le développement d'un microbiote plus diversifié ressemblant à celui d'un enfant plus âgé. Cette accélération de la maturation du microbiote pourrait affecter les effets bénéfiques du microbiote sur l'hôte pendant la petite enfance et est associée à un risque augmenté d'apparition d'asthme, d'obésité et de dermatite atopique chez l'enfant [104], [141]. En plus des différences d'alimentation, des études ont montré qu'il existe, à cet âge, une différence de composition du microbiote en fonction du sexe de l'enfant. Les enfants de sexe féminin possèderaient un microbiote contenant plus de *Lactobacillus et de Bifidobacteria* ce qui pourrait leur conférer une meilleure disponibilité des nutriments et une meilleure protection face aux changements environnementaux [143]–[145].

C. Le sevrage

Vers l'âge de 4 mois chez l'humain et de 3 semaines chez la souris commence la période de sevrage. L'introduction progressive d'une alimentation solide représente le facteur principal de diversification de la flore intestinale de l'enfant. C'est à ce moment-là que la composition du microbiote intestinal de l'enfant converge peu à peu vers celle d'un adulte [123]. Au niveau du côlon, c'est à ce stade que s'établissent des espèces qui lui sont spécifiques comme les *Fusobacteria et les Eubacteria* et que les espèces apportées et favorisées par l'allaitement comme les *Bifidobacteria* voient leur population diminuer. L'arrivée de nouvelles espèces entraîne une réaction immunitaire, appelée réaction de sevrage, nécessaire à la mise en place d'une immunité à la fois protectrice et tolérante face aux micro-organismes intestinaux [69].

D. La période post-sevrage

D'un point de vue populationnel, le microbiote est caractérisé par la prédominance d'espèces anaérobies, appartenant majoritairement au *Firmicutes,* et une α-diversité augmentée [123]. Sa composition est impactée par le niveau d'industrialisation, la prise de médicaments et le mode de vie de la personne. Par exemple, dans les pays industrialisés, la diversité du microbiote est inférieure à celle retrouvée dans des populations ayant un mode de vie rural [146]. Concernant l'impact du sexe biologique sur la composition du microbiote, la majorité des études de grandes populations n'observent pas de différence homme/femme [145] alors que d'autres en observe, et ce de façon indépendante du statut hormonale du groupe des femmes [147]. De façon constante, ils retrouvent une diversité supérieure chez les femmes, ainsi que moins de bactéries productrices d'acides gras à courte chaîne et d'*Actinobacter* mais plus de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* avant et après la ménopause [148]. Au-delà de 65 ans, la diversité du microbiote et l'abondance en *Bifidobacteria* diminuent indépendamment du sexe, et corrèlent avec la diminution de la santé des individus [130], [149].

III. Les modulations du microbiote intestinal

En l'absence de perturbations chroniques ou importantes, le microbiote intestinal et son environnement sont dans un état d'équilibre dynamique appelé eubiose [150]. Bien qu'il n'existe pas de définition précise d'un microbiote sain, il est généralement associé à une diversité, à une richesse élevée et à une stabilité fonctionnelle [146]. Un attribut majeur du microbiote est sa capacité de résistance et de résilience. Des perturbations externes peuvent altérer la composition du microbiote de façons transitoire et instable et un microbiote riche en diversité est capable d'y résister ou d'être assez résilient pour retourner à son état d'eubiose initial. Des atteintes répétées ou considérables telles que les changements drastiques d'alimentation, la prise d'antibiotiques, le stress ou encore les infections peuvent entraîner des changements de composition du microbiote appelés dysbiose. Comme l'eubiose, la dysbiose ne possède pas de définition claire mais elle est caractérisée par un changement drastique du microbiote en faveur d'une diminution de la richesse et de la diversité bactérienne [146], [150]. Pour rétablir un microbiote fonctionnel, différentes stratégies peuvent être envisagées comme l'utilisation de prébiotiques et de probiotiques.

A. Les prébiotiques

Les prébiotiques sont définis par l'OMS comme des ingrédients alimentaires résistants à la digestion par l'hôte qui induisent des changements spécifiques dans la composition et/ou l'activité du microbiote intestinal et ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte [151]. La ISAPP (Association Scientifique Internationale pour les Probiotiques et Prébiotiques) ajoute la notion de substrat sélectif à cette définition. Cela permet de différencier les molécules telles que la cellulose et les pectines qui sont utilisées par de nombreux micro-organismes probiotiques comme pathogènes [152], [153]. Ce concept a été introduit pour la première fois en 1995 par Glenn Gibson et Marcel Roberfroid [154], [155]. Les prébiotiques actuels sont majoritairement constitués de carbohydrates (fructo-oligosaccharide (FOS) et galacto-oligosaccharide (GOS)) et de polyphénols [151]. Ce paragraphe se concentrera sur les effets du FOS, le prébiotique utilisé durant ces travaux.

Le fructo-oligosaccharide ou FOS est un des prébiotiques le plus souvent utilisé et étudié. Il contient des liaisons glycosidiques β (2 → 1) fructosyl-fructose rendant sa digestion enzymatique impossible avant d'arriver au côlon [156]. Le FOS remplit toutes les conditions pour être considéré comme un prébiotique. En effet, il résiste à l'acidité gastrique, aux enzymes de l'hôte et à l'absorption intestinale, il est fermenté par les bactéries du microbiote intestinal et il favorise la croissance et l'activité de bactéries bénéfiques [156] [157]**.**

Lorsqu'il arrive au niveau du côlon, il est pris en charge par des bactéries bénéfiques comme les *Lactobacillus* ou les *Bifidobacteria* qui vont les fermenter en substances bioactives comme les AGCCs ou les vitamines. Pour être métabolisé, le FOS doit être dégradé en monosaccharides fermentables. Pour cela, les bactéries expriment des glycosides hydrolases intracellulaires ou extracellulaires qui vont libérer les fructoses composant le polymère de FOS [158]. Une fois internalisés, les monosaccharides sont fermentés en acétate, lactate, pyruvate, formate ou succinate par la voie des fructose 6-phosphate, phosphoketolase ou Bifid shunt pour les *Bifidobacteria* ou la voie Emden-Parnas pour les *Lactobacillaceae.* La première voie transforme le fructose en fructose 6-phosphate qui sera à son tour métabolisé en acétate ou en xylulose 5-P. A partir de cette molécule seront formés de l'acétate, du lactate, de l'éthanol, du formate ou du succinate. La voie Emden-Parnas transforme le fructose en pyruvate qui sera métabolisé en formate ou en acétyl-CoA qui sera fermenté en Butyrate [158] **(*Figure 30)***.

Différents effets, favorables pour l'homéostasie de l'hôte, peuvent être attribués au FOS : promotion de la croissance de probiotiques, diminution de la croissance de pathogènes comme *Escherichia* coli, activation du système immunitaire, diminution du risque de cancer colorectal et diminution de l'inflammation intestinale [156]. Une partie de ces effets passe par l'augmentation de la production d'AGCCs. Un paragraphe sera consacré à ces molécules dans le chapitre suivant.

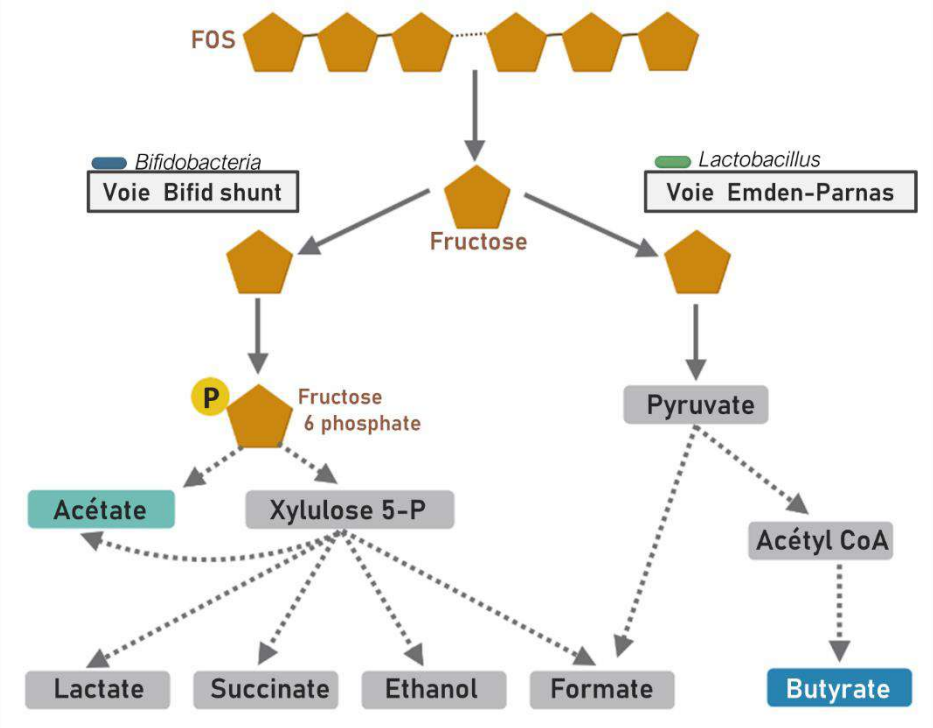


Figure 30 : La fermentation du FOS

B. Les probiotiques

Concept développé par Henry Tessier et Elie Metchnikov dans les années 1900, le terme de probiotique a été utilisé pour la première fois en 1954 par Ferdinand Vergin. En développant la culture anaérobie, H. Tissier identifie que, contrairement aux descriptions antérieures, *Escherichia coli* n'est pas majoritaire dans la flore infantile mais que c'est une autre bactérie qu'il nommera *Bacillus bifidus.* A partir de ces résultats, il décrit plusieurs « bonnes bactéries » qui sont abondantes en conditions normales mais dont l'abondance diminue lors de diarrhée. Lorsqu'il donne certaines de ces bactéries comme traitement à des enfants souffrant de maladies intestinales, il observe que leur état s'améliore et lie l'introduction de ces bactéries à leur guérison. Metchnikov, lui, émet l'hypothèse qu'il est possible de contrebalancer l'effet de bactéries néfastes et de leurs « poisons » en utilisant des bactéries bénéfiques. Très intéressé par l'augmentation de la longévité, il attribue celle des paysans Bulgares à leur grande consommation de *Bacilles* dans les yaourts [99].

Les probiotiques sont définis par l'OMS comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont donnés en quantités adéquates, confèrent un effet bénéfique à l'hôte [99]. Pour être considérée comme probiotique, une bactérie doit répondre à plusieurs critères : être

suffisamment caractérisée, être sûre d'utilisation, être vivante et avoir démontré son efficacité dans des études contrôlées chez l'humain. Les effets bénéfiques des probiotiques passent, entre autres, par la modulation du système immunitaire, la production de molécules bactéricides et le rétablissement de la barrière épithéliale intestinale [151]. La plupart des probiotiques utilisés ont été caractérisés parmi les bactéries commensales de l'intestin humain [153] comme, par exemple, les 3 bactéries impliquées dans les études que nous avons menées : *Escherichia coli Nissle 1917, Holdemanella biformis* et *Ligilactobacillus murinus/animalis***.**

1. *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)

Nommées « *Bacterium coli communior »* lors de leur description en 1885 et 1886 par Theodor Escherich, les *Escherichia coli* appartiennent à la famille des *Enterobactériaceae* [99] ***(Figure 31)***. Les *E. coli* sont des bactéries à Gram $^{-}$, en bâtonnets et sont anaérobies facultatives. Elles possèdent un flagelle pour se déplacer ou des pilis pour adhérer à la surface des cellules. Environ 90 % de la population humaine possèdent des *E. coli* au sein de son tractus digestif. Ces bactéries sont réparties en 7 groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, D, E et F) qui regroupent des bactéries commensales, pathogènes et probiotiques [159]. Le groupe phylogénétique B2 contient des *E. coli* possédant une capacité accrue de colonisation et d'implantation dans le tractus digestif humain. Dans la population française, 34% des *E. coli* du TD appartiennent à ce groupe. Il est hautement hétérogène et renferme à la fois des bactéries commensales et pathogènes, mais aussi probiotiques comme *EcN* [159]**,** [160], [161].

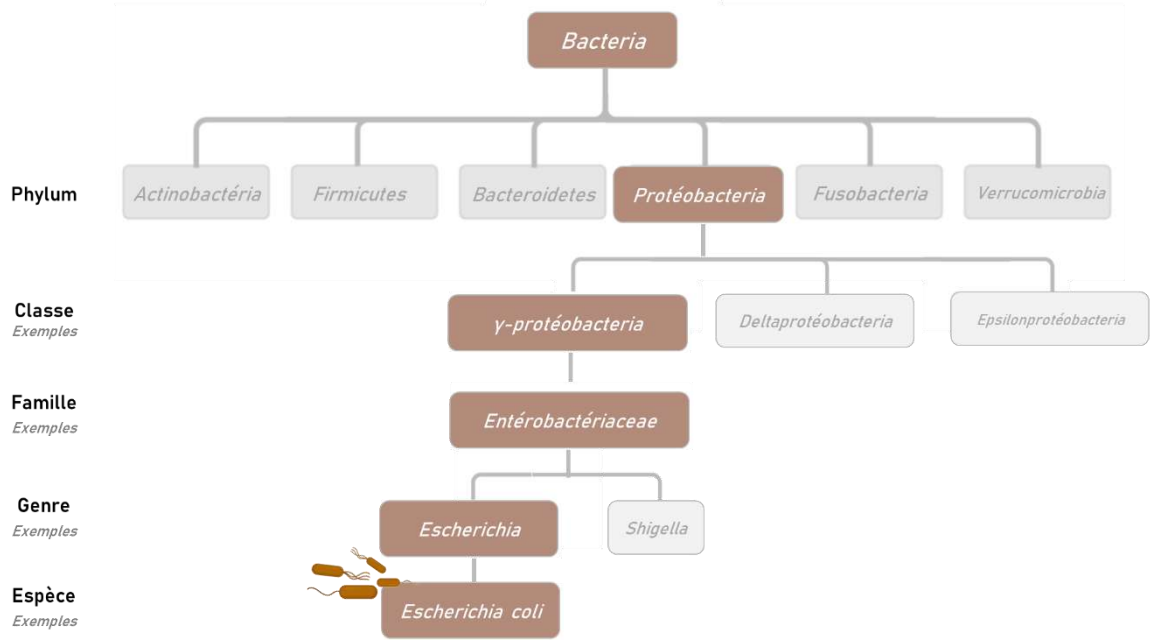


Figure 31 : Arbre phylogénétique d'*Escherichia coli*

EcN est une souche probiotique d'*Escherichia coli* du groupe phylogénétique B2, décrite pour la première fois par Alfred Nissle. Pendant la première guerre mondiale, il remarque son effet bénéfique en l'isolant du microbiote d'un de ses caporaux inaffectés par la dysenterie [99], [162], [163]. Vendue en tant que probiotique dans certains pays sous le nom de Mutaflor® depuis 1917, son utilisation y est indiquée dans les cas de constipation chronique, dans les phases de rémission de la rectocolite hémorragique et dans le syndrome de l'intestin irritable. Son utilisation en tant que probiotique dans des études cliniques et pré-cliniques a permis d'identifier certains de ces mécanismes d'action sur l'hôte [164], [165]. Tout d'abord, cette souche probiotique a des activités antagonistes de micro-organismes pathogènes comme *Salmonella thyphymurium* ou *Candida albicans, in vitro et in vivo,* et limite la présence de bactéries dans la couche stérile du mucus intestinal lors d'essais cliniques menés chez des patients souffrants de MICI [162]. Cette activité passe par la sécrétion de microcines, de petites molécules antibactériennes composées de quelques acides aminés. EcN possède également des effets immunomodulateurs. *In vivo,* chez le porcelet et lors d'essais cliniques chez le nouveau-né, elle augmente la proportion d'IgA et d'IgM sécrétées dans les fèces. Dans les modèles murins de colites induit par le DSS, EcN présente des activités anti-inflammatoires constantes à travers les études : diminution de la concentration de cytokines pro-inflammatoires via TLR-2 et TLR-4, diminution des scores de sévérité de la colite et diminution des dommages épithéliaux microscopiquement et macroscopiquement [162],

[166]. Enfin dans un modèle d'hypersensibilité viscérale induite par le TNBS chez le rat, son administration orale diminuait la réponse aux distensions colo-rectales [162].

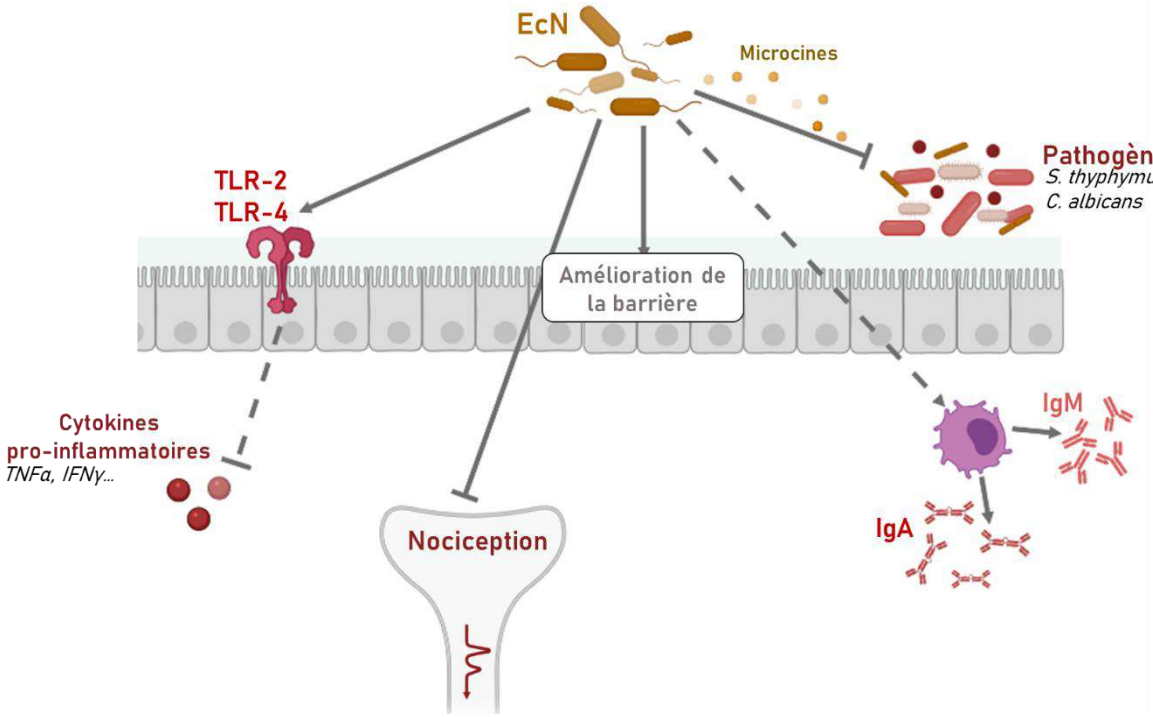


Figure 32 : Effets probiotiques *d'Escherichia coli Nissle* 1917

2. Holdemanella biformis

Holdemanella biformis appartient à la famille des *Erysipelotrichaceae* et est une bactérie Gram $^{+}$, anaérobie stricte, en forme de coque, non motile et non sporogène [167]–[170] **(*Figure 32*)**. Longtemps classée chez les *Eubactéries,* elle est souvent identifiée *Eubacterium biforme* dans la littérature. Cette bactérie, isolée de fèces humains et diminuée chez les personnes atteintes par un adénome rectal, est peu caractérisée. Les études menées sur cette espèce ont déterminé qu'elle produit du butyrate à partir d'acétyl-CoA [171]. Son rôle bénéfique a également été décrit dans le cancer colorectal chez la souris où, tout comme son homologue murin *Faecalibaculum rodentium,* elle diminue la croissance tumorale *in vivo.* Cet effet bénéfique était dû à un métabolite sécrété puisque le traitement des souris avec le milieu de culture fermenté par les bactéries entraînait des effets similaires. Dans un modèle d'obésité, cette bactérie améliore la tolérance au glucose et diminue les quantités plasmatiques de GLP-1 et PYY, ce qui suggère que

son effet pourrait être médié via les cellules entéro-endocrines. Les AGCCs produits par cette bactérie pourrait être à l'origine de ses effets antitumoraux [170] ***(Figure 34)***.

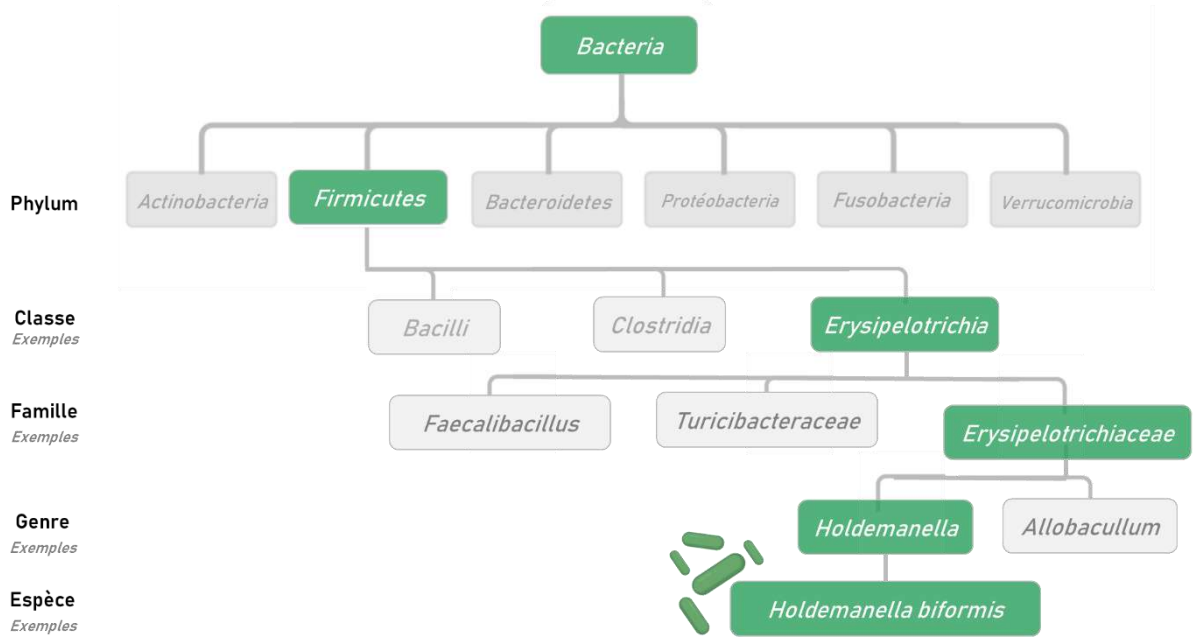


Figure 33 : Arbre phylogénétique d'*Holdemanella biformis*

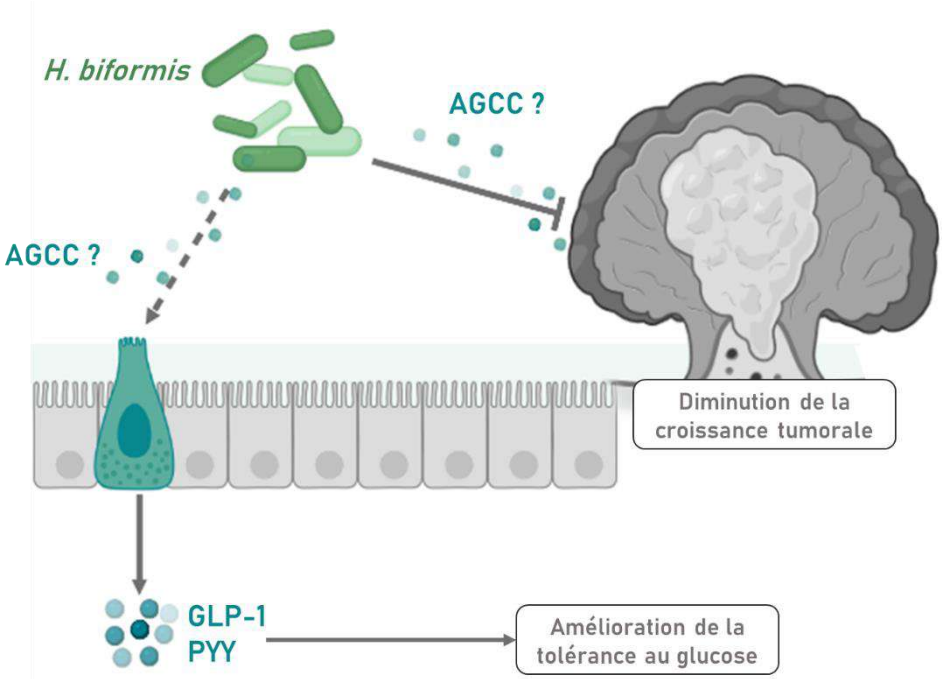


Figure 34 : Effets probiotiques d'*Holdemanella biformis*

3. *Ligilactobacillus murinus/animalis*

Le genre des *Lactobacillus* décrit en 1901 par Beiierinck a été établi sur la base de la morphologie et des propriétés physiologiques des bactéries qui le composent. [172]. Les *Lactobacillus* appartiennent au phylum des *Firmicutes* et à la famille des *Lactobacillaceae* et sont caractérisés par leur forme en bâtonnet et leur production d'acide lactique **(*Figure 35)***. Ces bactéries Gram $^{+}$ sont immobiles, non flagellées, non sporogènes et anaérobies facultatives. Les *Lactobacillus* ont été parmi les premières espèces de bactéries décrites pour leurs effets probiotiques. C'est en 1935 qu'est commercialisé pour la première fois *Lactobacillus casei shirota*. Les *Lactobacillus* sont des espèces fortement retrouvées au niveau des milieux riches en glucose comme les muqueuses intestinales, orales et vaginales où ils représentent 90 à 100% des bactéries. Dans l'intestin, avant la mise au point des techniques de cultures anaérobies, les *Lactobacillus* étaient considérés comme un genre dominant du microbiote intestinal. En réalité ils représentent moins de 2% de la population bactérienne [173]. Les *Lactobacillus* les plus abondants sont les *L. rhamnosus, L. casei et L. murinus.* Ce dernier, rarement isolé en dehors du TD, est considéré comme un micro-organisme autochtone de l'intestin [174].

Différentes espèces de Lactobacillus sont utilisées comme probiotiques. Par exemple, *L. salivarus,* et *L. casei* participent à la maturation du système immunitaire *via* l'augmentation des pourcentages de monocytes et d'IgA, IgM et IL-10 plasmatiques chez des volontaires sains ou dans la lamina propria de souris [175]. Les effets bénéfiques des *Lactobacillus* peuvent être induits par leur fixation sur TLR-2. En effet, les composants majoritaires de leur membrane sont des peptidoglycans, ligands de TLR-2 [175]. Leur capacité à produire du lactate qui perméabilise la membrane des bactéries Gram $^{-}$ et qui diminue le pH de l'environnement minimise la croissance d'autres bactéries dont des pathogènes [165][176]

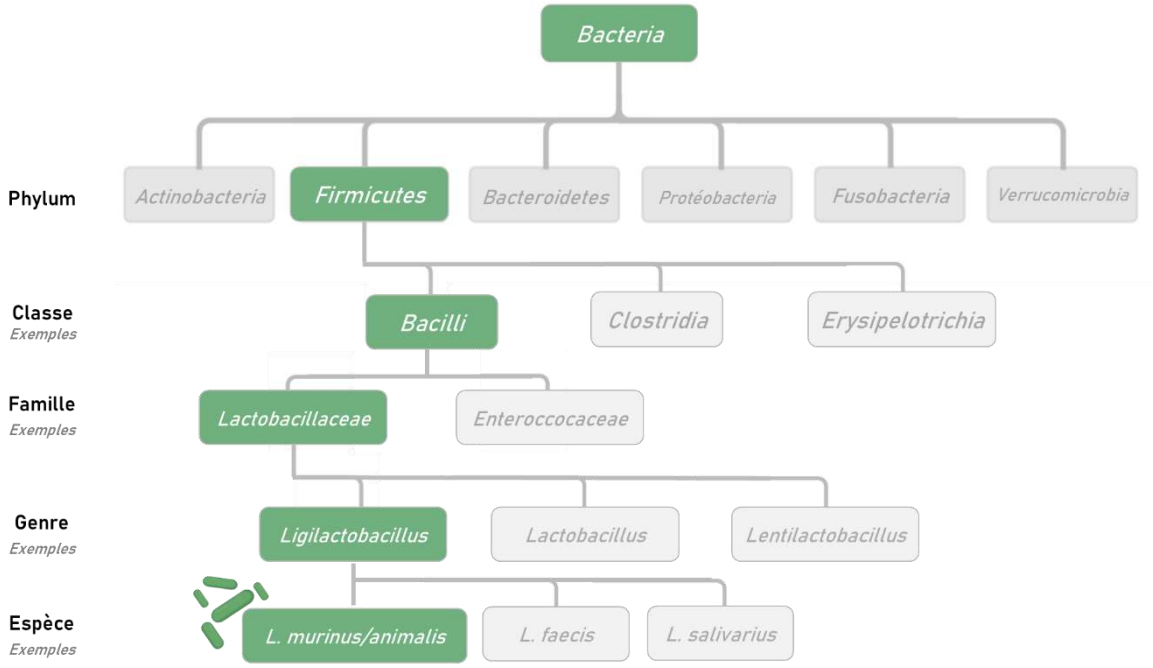


Figure 35 : Arbre phylogénétique de *Ligilactobacillus murinus/animalis*

En 2015, plus de 200 espèces de *Lactobacillus* différentes étaient regroupées dans le même genre en dépit de leur grande diversité génétique et métabolique [177]. Des analyses phylogénétiques menées en 2020 ont permis de reclassifier ces espèces en 24 genres différents. Le *Lactobacillus murinus* étudié ici est donc dorénavant classé dans le genre des *Ligilactobacillus* [178]. Dans une majorité d'études, *L. murinus et L. animalis* sont considérés comme étant une seule et même espèce. Difficilement identifiables par les techniques classiques de caractérisation métabolique, ils se ressemblent également fortement d'un point de vue génétique puisque leurs ARN 16S présentent peu de différences. Il est donc suggéré de les identifier en tant que *L. murinus/animalis* et c'est ce que nous ferons dans notre étude [179]. Cette espèce est moins étudiée que d'autres *Lactobacillus.* Ces dernières années, elle a été impliquée dans la diminution de la sévérité de l'entérocolite nécrosante néonatale ou de l'inflammation associée au vieillissement en lien avec la perméabilité intestinale et l'inflammation systémique [180]–[183]. Cependant, ses mécanismes d'action sont encore peu décrits **(*Figure 36)***.

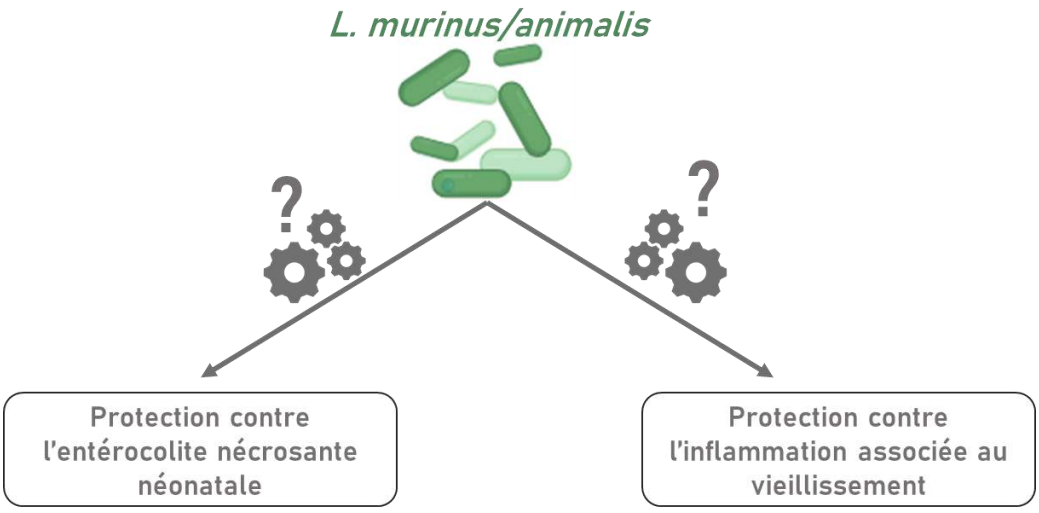


Figure 36 : Effets probiotiques *de Ligilactobacillus murinus/animalis*

Bien que de nombreux probiotiques et prébiotiques aient été décrits comme ayant des propriétés bénéfiques *in vitro* ou *in vivo*, la translation en recherche clinique n'est pas toujours concluante. L'utilisation d'un prébiotique, d'une espèce ou d'une souche bactérienne, ne permet pas d'obtenir les effets bénéfiques attendus de façon constante d'une étude à l'autre [184]. C'est pourquoi, il semble important, au-delà de la taxonomie, d'étudier les molécules produites par le microbiote intestinal qui participent à ces effets bénéfiques [151], [153]. Ces métabolites appelés « postbiotiques », sont majeurs dans la compréhension des interactions entre l'hôte et son microbiote.

Chapitre 3 : Les métabolites sécrétés par le microbiote intestinal

I. La redondance fonctionnelle du microbiote intestinal

Les modifications du microbiote intestinal et leur implication dans la physiopathologie de l'hôte ont surtout été étudiées d'un point de vue taxonomique mais peu d'études ont caractérisé ces changements d'un point de vue métabolique [185]. Des études menées sur de larges cohortes ont montré que, malgré les faibles taux de similarités (~45%) entre les espèces présentes dans le microbiote intestinal de deux personnes sélectionnées aléatoirement, 82% des voies métaboliques étaient communes [186]–[188] ***(Figure 37)***. Le même constat a pu être établi pour certaines pathologies comme le lupus ou les diarrhées associées à *Clostridium difficile.* Dans ces cohortes, bien que les changements de taxonomie étaient différents entre les patients, leur microbiote présentait les mêmes altérations fonctionnelles [189]. La composition des microbiotes humains et murins ne sont pas similaires **(Chapitre 2)** mais d'un point de vue métabolique, ils partagent les mêmes fonctionnalités [190]. Ces études montrent qu'il existe au niveau du microbiote intestinal une redondance fonctionnelle, importante pour la résilience du microbiote intestinal et le maintien d'une communication inaltérée avec l'hôte.

La redondance fonctionnelle est la capacité de plusieurs espèces bactériennes, apparentées ou non, à remplir les mêmes fonctions. Ainsi, des combinaisons variables d'espèces bactériennes différentes pourraient présenter les mêmes fonctions chez des individus différents [185]. Il n'existe pas encore de consensus pour définir que deux espèces sont fonctionnellement redondantes pour une voie métabolique donnée. Certains auteurs considèrent qu'elles le sont uniquement si elles sont totalement interchangeables, d'autres si elles possèdent la même fonction métabolique à la même vitesse dans des environnements identiques [191]. Les mécanismes impliqués dans l'établissement de ces communautés ne sont pas encore compris

mais ces études montrent qu'au-delà de la taxonomie, il est important de s'intéresser aux métabolites du microbiote intestinal et à leurs effets sur l'hôte [185].

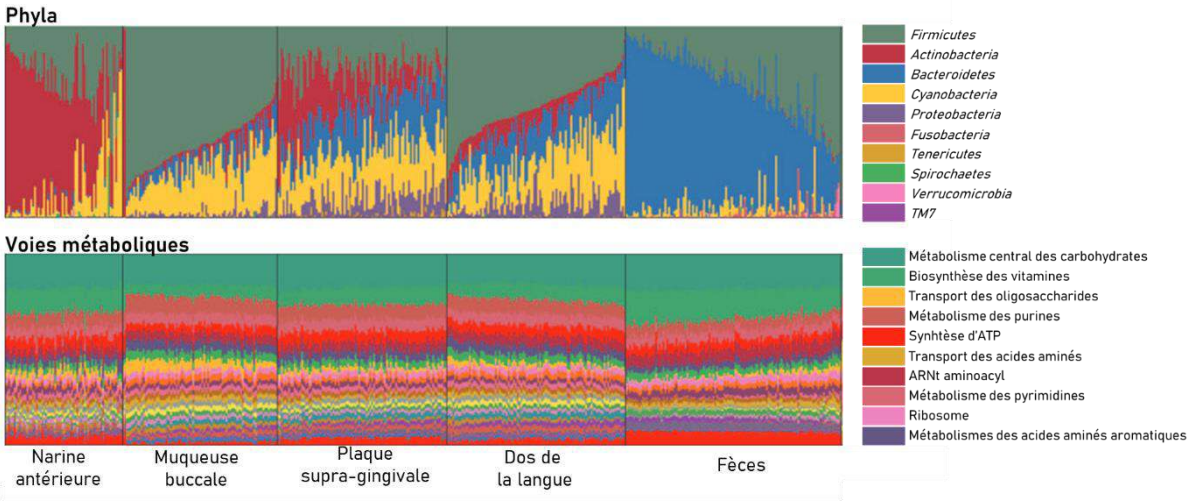


Figure 37 : La redondance fonctionnelle du microbiote du tractus digestif

Adaptée de Huttenhower et al 2012 [192]

Représentation des échantillons de microbiome par zone corporelle identifiés par séquençage de l'ARN 16S pour le phyla et par shotgun pour les modules métaboliques

II. Les métabolites du microbiote intestinal

A. Généralités & historique

Dès 1868, le médecin allemand Hermann Senator émet l'hypothèse que le TD produit des « poisons » capables d'avoir des effets systémiques. Pendant les décennies suivantes, les études scientifiques confirment cette hypothèse de « l'auto-intoxication » et le rôle des bactéries du côlon dans la production de ces molécules [99]. Plus récemment il a été montré que les bactéries du microbiote intestinal produisent différents métabolites ayant un impact bénéfique ou néfaste sur la santé de l'hôte. Les postbiotiques, définis comme « toute molécule soluble issue de l'activité métabolique d'un probiotique qui lorsqu'il est administré dans une quantité adéquate confère des bénéfices à la santé de l'hôte par des mécanismes directs ou indirects », représentent une nouvelle piste de développement de molécules thérapeutiques [193]. Les métabolites bactériens sont tous des molécules modifiées ou synthétisées par les bactéries du microbiote intestinal. Ils proviennent de trois sources différentes : la métabolisation des composants alimentaires, la modification des bioproduits de l'hôte ou la synthèse de molécules

de novo [32]. Ces métabolites appartiennent à différentes familles de molécules (polysaccharides, protéines, lipides, vitamines) [32], [194], [195], et remplissent différentes fonctions (neurotransmetteurs, toxines, molécules pro ou anti-inflammatoires, …) [195], [196] [197] **(*Figure 38*)**.

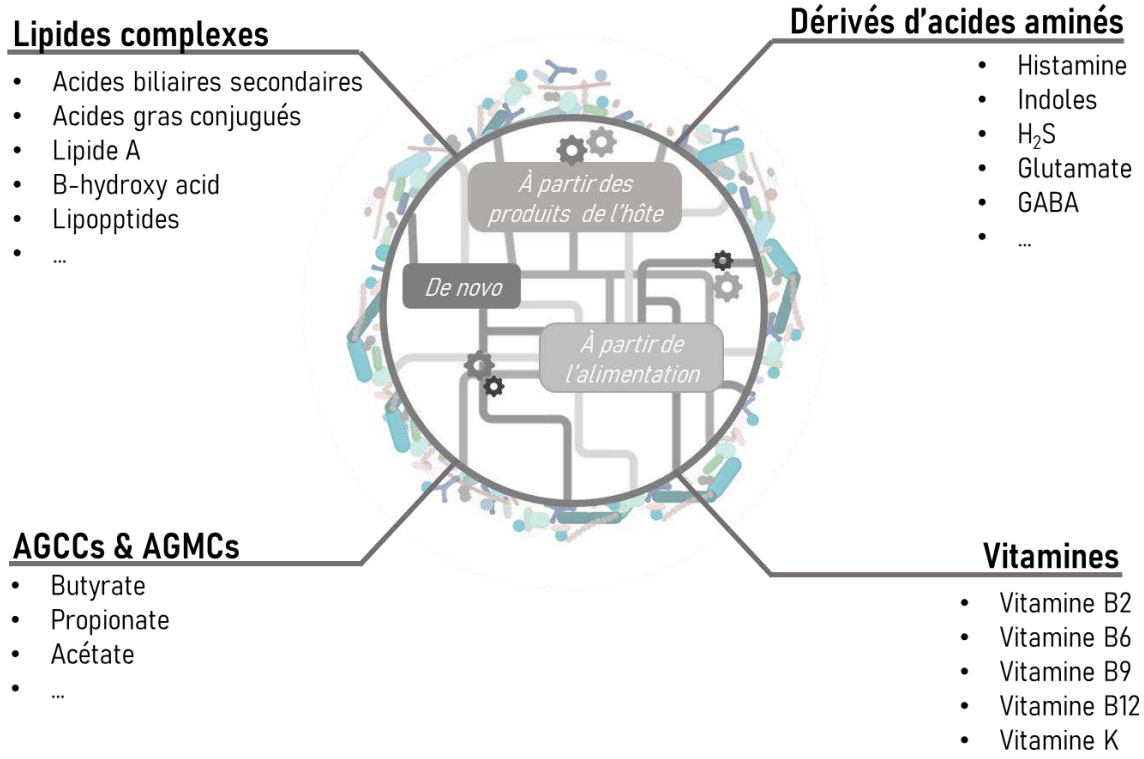


Figure 38 : Les métabolites sécrétés du microbiote intestinal

B. Les métabolites non lipidiques

1. Les vitamines

Les vitamines sont des micronutriments nécessaires en faible quantité et pour la plupart non synthétisables par l'être humain. Une partie provient de l'alimentation et est absorbée au niveau de l'intestin grêle. Une autre est produite au niveau du côlon par les bactéries du microbiote intestinal comme les *Bifidobateria* ou les *Lactobacillus*. En effet, ces bactéries peuvent synthétiser *de novo* différentes vitamines, comme la vitamine K, et plusieurs vitamines B (B2, B6, B9, B12). Elles vont ensuite être absorbées par les colonocytes et agir localement, notamment sur le maintien de la fonction de barrière, mais aussi passer dans la circulation sanguine et pouvoir être métabolisées par d'autres organes [32], [197]–[200] **(*Figure 40)***.

2. Les métabolites des acides aminés

a) L'histamine

L'histamine est produite par le microbiote intestinal à partir de l'histidine alimentaire (acide aminé essentiel). Plusieurs espèces bactériennes comme *E. coli* ou *L. reuteri* produisent de l'histamine grâce à leur histidine décarboxylase. Cette molécule inhibe la production de TNFα induite par l'activation des TLRs par les PAMPs et augmente la production d'IL-10 par le système immunitaire. Elle a donc un effet anti-inflammatoire. En revanche, en activant H_1R exprimé sur les nocicepteurs, elle sensibilise TRPV1 et a des effets pro-algiques [195], [196] [201] **(*Figure 40)***.

b) Les indoles

Les indoles sont formés par plus de 80 espèces bactériennes, appartenant au genre *Clostridium, Lactobacillus* ou *Bacteroides,* à partir du tryptophane alimentaire (acide aminé essentiel). Leur production par le microbiote intestinal n'est que partielle puisque chez les souris axéniques, leur présence dans les fèces n'est pas totalement supprimée mais diminuée de 27%. Ces molécules sont des ligands du récepteur d'aryl hydrocarbon (AhR) qui a un rôle important dans l'homéostasie de la muqueuse intestinale. La fixation des indoles sur leur récepteur entraîne la production d'IL-22 par les cellules lymphoïdes ce qui augmente la survie et la prolifération des CEI et la production de PAMs. Ils possèdent également un effet bénéfique sur la barrière intestinale en augmentant l'expression des protéines des jonctions serrées. Au niveau du microbiote, ils sont importants dans la structuration des communautés bactériennes en régulant la formation du biofilm [32], [202], [195], [203] **(*Figure 40)***.

c) Le sulfure d'hydrogène (H2S)

Il est produit à partir de la dégradation d'acides aminés contenant du soufre comme la cystéine et la méthionine par la cystathionine γ-lyase (CSE) de bactéries comme les γ-protéobacteria. Le sulfure d'hydrogène possède des effets anti-inflammatoires sur la muqueuse intestinale à de faibles concentrations et pro-inflammatoires à de fortes concentrations. Dans le premier cas, en diminuant l'expression de TNF-α, la production de mucus et en restaurant le biofilm microbien, l'injection intra colique d'H_2S favorise la réparation des tissus lésés et la résolution de l'inflammation des muqueuses dans des modèles de colite induite par le DSS.

Cependant, à de plus fortes doses, il aggrave la sévérité de la colite et induit de l'hypersensibilité viscérale via l'activation du canal calcique Cav3.2 et de TRPA1 dans des modèles murins [204] **(*Figure 40)***.

d) Le glutamate et le GABA

Le glutamate, neurotransmetteur excitateur, est produit à partir de glucose par certaines bactéries comme *L. plantarum* ou *L. lactis.* L'utilisation du glucose dans le cycle de Krebs participe à la formation d'acide α-ketoglutarique qui, grâce à une glutamate déhydrogénase est transformé en glutamate. Il peut également être importé du milieu environnement par un transporteur GadC. Comme les eucaryotes, certaines bactéries transforment le glutamate en GABA (γ-amino butyrique acid) grâce à l'action de glutamate décarboxylase (*Gada ou Gadb)* ou en produisent comme intermédiaire lors de la transformation d'arginine en putrescine [205] [206]. Enfin, le GABA est sécrété dans le milieu extra-cellulaire par GadC [205]. *E. coli, L. reuteri,* comme d'autres micro-organismes dégradent le GABA en le transformant en acide succinique pour retourner dans le cycle de Krebs [205]. Les gènes exprimant les enzymes nécessaires à la formation du GABA sont regroupés en système de clusters de gènes situés dans les chromosomes ou dans les plasmides bactériens. Cette variabilité peut être observée au sein de souches d'une même espèce [205] **(*Figure 39)***.

La sécrétion du GABA module l'environnement du microbiote en diminuant l'acidité du milieu ce qui empêche la croissance de certaines espèces pathogènes [206]. Concernant la communication avec l'hôte, contrairement au glutamate qui est un neurotransmetteur excitateur, le GABA inhibe l'activation neuronale. Toutefois, une étude menée par l'équipe en 2017 [207] a montré que le GABA seul ne traverse pas l'épithélium intestinal, contrairement aux lipopeptides contenant du GABA qui feront l'objet d'un paragraphe [208] [195] **(*Figure 40)***.

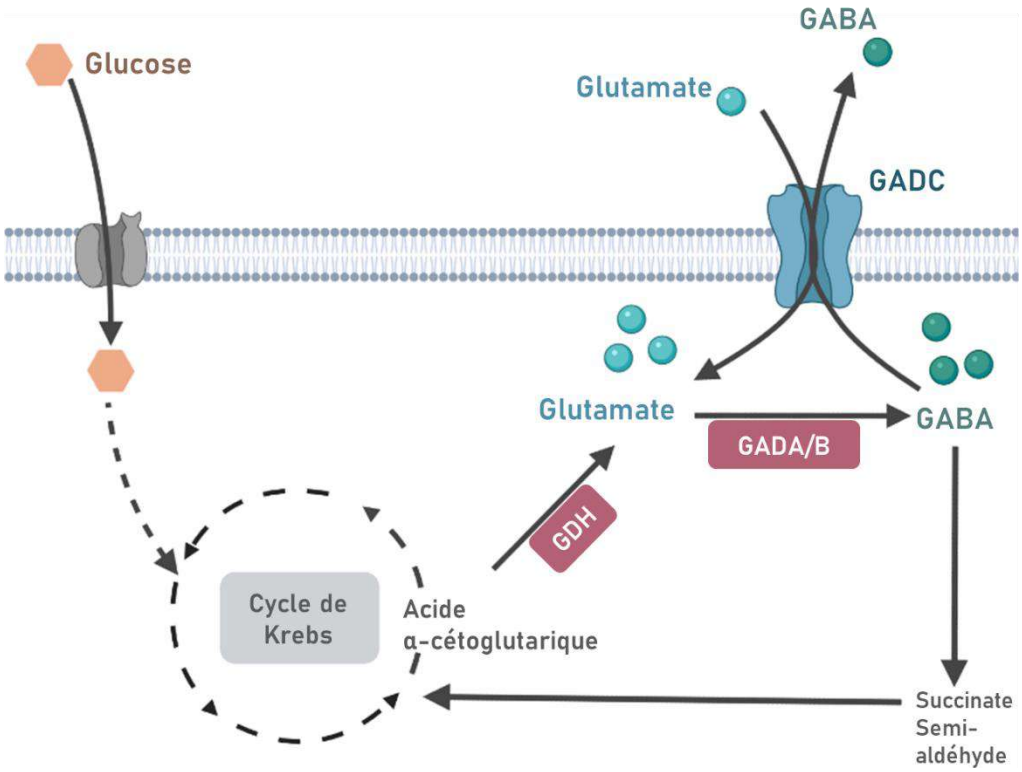


Figure 39 : Synthèse du glutamate et du GABA

e) Les autres métabolites non lipidiques du microbiote intestinal

En plus des métabolites des acides aminés décrits précédemment, les bactéries du microbiote intestinal sont capables de produire d'autres métabolites, souvent moins décrits ou découverts récemment comme, par exemple, la production par les bactéries de la sérotonine à partir du tryptophane [195]. Les bactéries du microbiote sont également capables de produire des triméthylamines qui dérivent du métabolisme de la choline [209], des polyamines dérivées de la dégradation de l'arginine alimentaire [32] ou encore des catécholamines à partir de la L-tyrosine [210]. Il existe également des métabolites provenant d'autres voies de métabolisation comme les N-formyl peptides qui sont algésiques ou des neurotoxines qui inhibent la neurotransmission [196].

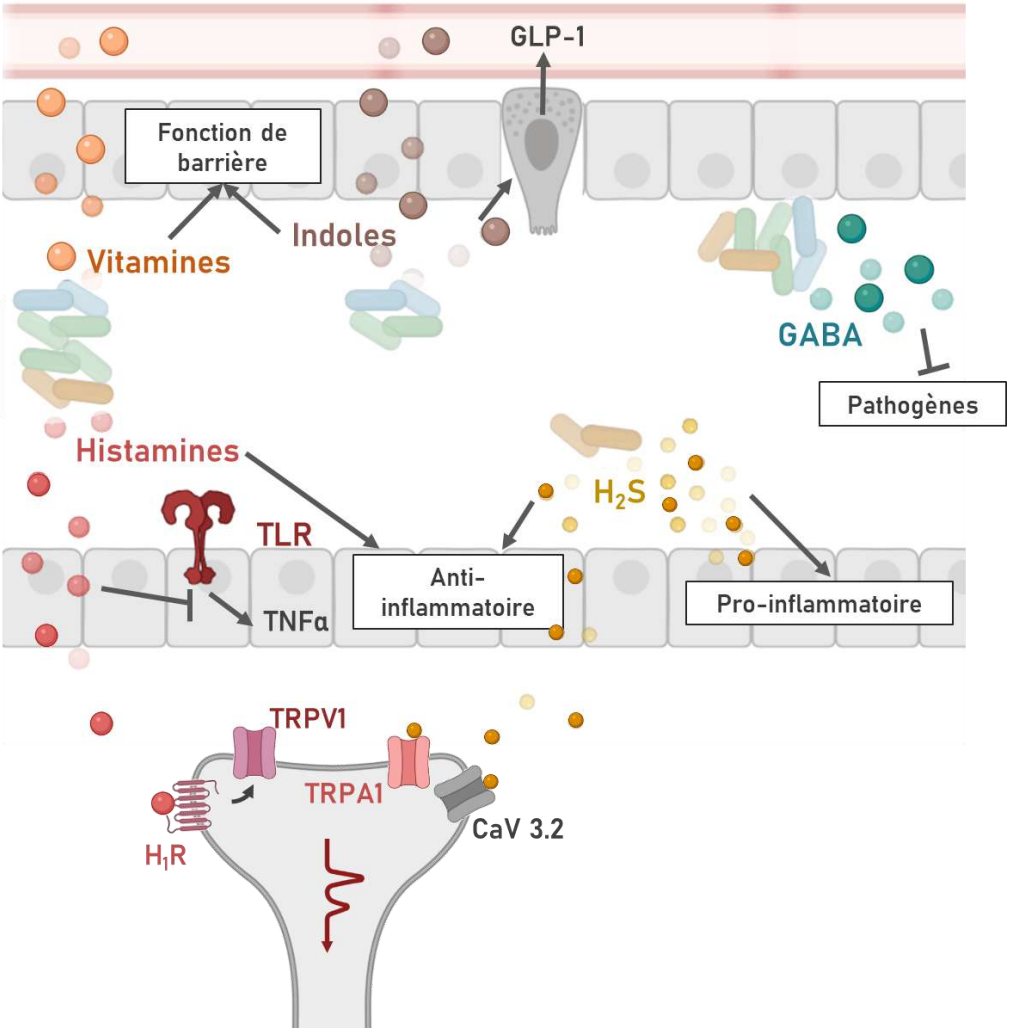


Figure 40 : Effets des métabolites non lipidiques du microbiote intestinal

C. Les métabolites lipidiques

En 2020, Yasuda *et al.* [194], ont réalisé des analyses lipidomiques avec et sans à priori des lipides présents dans les fèces de souris contrôles ou traitées par des antibiotiques à large spectre. L'analyse avec à priori a permis de constater que sur 136 molécules ciblées, la concentration de 23 d'entre-elles était diminuée d'au moins un facteur 10 dans les souris traitées par des antibiotiques. L'analyse sans à priori par comparaison de spectre a montré que parmi les 10 010 pics identifiés, 25% d'entre eux étaient diminués d'au moins un facteur 10 chez les souris ayant reçu des antibiotiques. Ces deux approches ont permis de conclure que 26% des lipides présents dans les fèces des souris dépendent du microbiote pour leur production, soit 225 molécules. Les lipides produits par le microbiote intestinal regroupent deux grandes classes de molécules, les acides gras à courte et moyenne chaîne et leurs dérivés, et les lipides complexes possédant un nombre de carbone plus important.

1. Lipides à courte et moyenne chaîne et leurs dérivés

a) Généralités

Les acides gras à courte chaîne produits par le microbiote intestinal (moins de 6 atomes de carbone) sont composés de l'acide formique (C1), l'acide acétique ou acétate (C2), l'acide propionique ou propionate (C3), de l'acide butyrique ou butyrate (C4), de l'acide valérique ou valérate (C5), et de l'acide caproïque ou caproate (C6) **(*Figure 41)***. Les acides gras à moyenne chaîne sont eux composés de l'acide heptanoïque (C7), de l'acide octanoïque (C8), de l'acide nonanoïque (C9) et de l'acide caprique (C10). Plus récemment ont été ajoutés à ces listes les versions branchées, c'est-à-dire avec un groupe méthyl (CH_3) branché sur le dernier atome de carbone de certains de ces AG : l'isobutyrate, l'isovalérate, et l'isocaproate formés à partir de la fermentation d'acides aminés branchés (valine, leucine et isoleucine) [211] ***(Figure 41)***. L'acétate, le propionate et le butyrate représentent 95% des AGCCs produits par le microbiote intestinal et sont retrouvés à un ratio de 60:20:20 respectivement. Ce sont les métabolites bactériens les plus étudiés et seront les seuls abordés dans cette partie. Ils seront désignés par acides gras à courte chaîne ou AGCCs [32], [197].

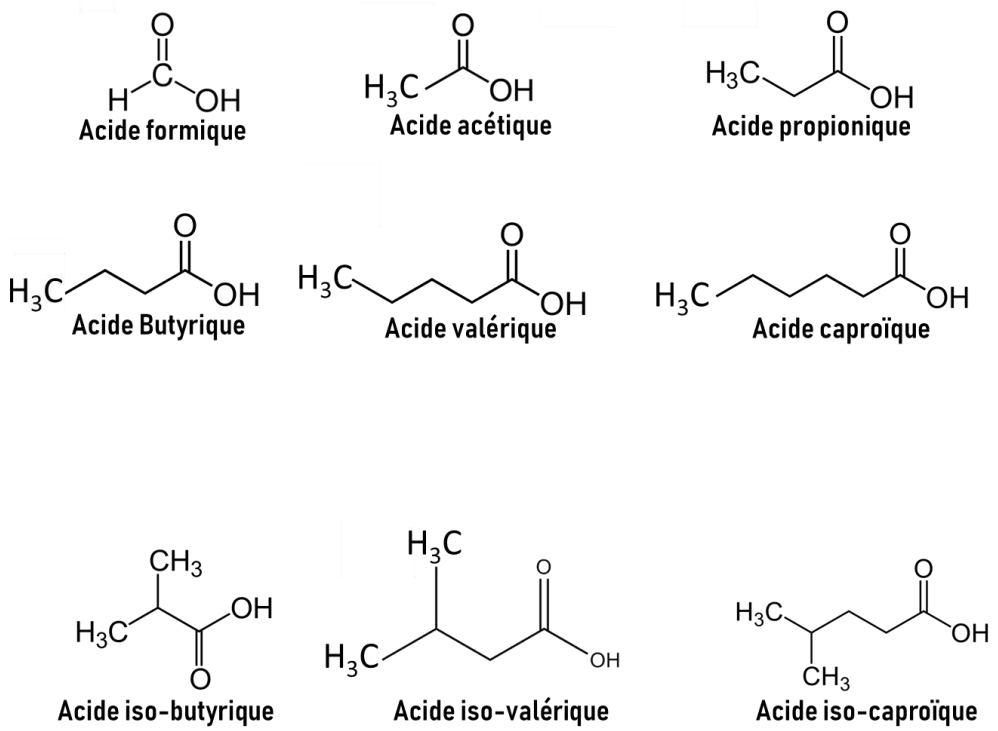


Figure 41 : Structures des acides gras à courte et moyenne chaîne

Les AGCCs dérivent de la fermentation des fibres alimentaires qui ne peuvent pas être dégradées par les enzymes intestinales pendant la digestion. Elles arrivent intactes au niveau du côlon et sont métabolisées par les bactéries du microbiote intestinal dans un gradient décroissant du côlon proximal vers le côlon distal. Facilement absorbables par les colonocytes, seulement 5% des AGCCs produits sont éliminés via les fèces [32]. Ils sont absorbés par les colonocytes via deux transporteurs, MCTs qui est proton dépendant et SMCT qui est sodium-dépendant [32]. Ils représentent une source d'énergie importante puisque chez l'humain ils constituent environ 10% des besoins caloriques journaliers [212]. Les colonocytes en dérivent 60 à 70% de leur énergie, préférentiellement à partir du butyrate. Ceux qui ne sont pas métabolisés entrent dans la circulation sanguine et atteignent le foie où 70% de l'acétate et 30% du propionate sanguins seront métabolisés [32] [212]. Bien qu'une minorité d'AGCCs se retrouvent dans la circulation périphérique, ils peuvent avoir des effets sur d'autres organes, et traversent la barrière hémato-encéphalique puisque 0–171 µM d'acetate, 0–6 µM de propionate, et 0–2.8 µM de butyrate sont retrouvés dans le liquide céphalorachidien humain [213].

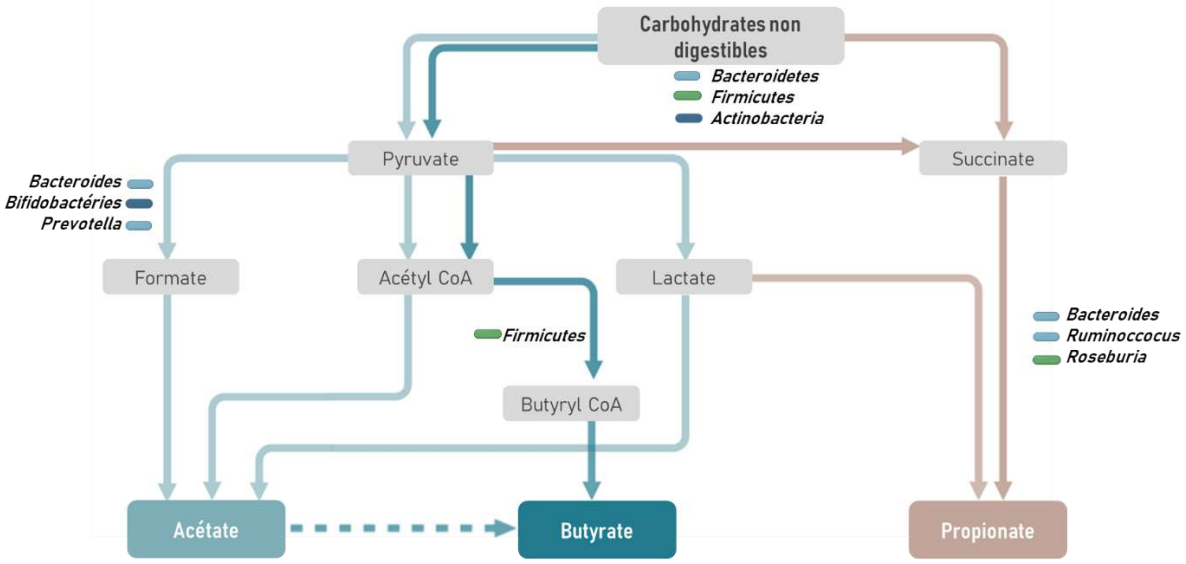


Figure 42 : Synthèse des acides gras à courte chaîne

b) L'acétate

Produit en grande quantité par les *Bacteroides, les Bifidobacteria, et les Prevotella* à partir du pyruvate, du formate ou de l'acétyl-CoA, l'acétate est l'AGCC le plus abondamment retrouvé dans la circulation sanguine ***(Figure 42)***. Il possède des effets sur l'intestin et sur des organes à distance comme le tissu adipeux blanc ou le foie, où 70% de l'acétate est métabolisé pour ses capacités énergétiques mais aussi pour former du cholestérol et des AG à longue chaîne [212], [214], [215]. Il peut aussi être utilisé par les bactéries pour former du butyrate ou avoir des effets localement. Au niveau intestinal, il favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs en T effecteurs de types TH1/TH17 ou en T régulateurs [216] en inhibant l'activité de l'histone déacétylase (HDAC). En plus de cette action indépendante de ses récepteurs, *in vivo,* il possède des effets anti-inflammatoires dans la colite induite par le DSS en se fixant sur GPR43 [217]. L'activation de ce récepteur entraîne également la libération de PYY et de GLP-1, des hormones anorexigènes par les cellules entéro-endocrines. ***(Figure 43)***.

c) Le propionate

Le propionate est majoritairement produit par les *Bacteroides, les Ruminoccocus et les Roseburia* à partir du succinate ou du lactate [32] ***(Figure 42)***. Il est très facilement absorbé par les CEI et est rapidement métabolisé par le foie [215], [218] ***(Figure 43)***. Au niveau intestinal, il

agît de la même manière que l'acétate pour moduler la libération de PYY et de GLP-1, et pour favoriser la différenciation des lymphocytes T régulateurs.

d) Le butyrate

Le butyrate est la source primaire d'énergie des CEI au niveau du côlon [196]. Il est produit par les *Firmicutes* à partir de butyryl-CoA et d'acétyl-CoA ***(Figure 42)***. Son action anti-inflammatoire a été largement étudiée et plusieurs mécanismes d'actions ont été identifiés. Par sa fixation sur PPARγ, il inhibe NFκB et ainsi l'expression de gènes codant pour des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires [195], [219], [220]. Par l'activation du GPR109a, il participe à la différenciation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs qui ont un rôle bénéfique dans la colite [221]. La présence de butyrate a également un effet sur la barrière épithéliale intestinale. L'activation du GPR43 par le butyrate permet l'augmentation de l'expression de MUC2 et TFF3, stabilisant la couche de mucus, des cathélicidines et des défensines. Elle augmente donc la protection face aux micro-organismes, ainsi que l'expression et la relocalisation de protéines des jonctions serrées, renforçant le contrôle de la barrière [222]–[224], [225]. Via l'inhibition de HDAC, il empêche la maturation des cellules dendritiques et des macrophages vers un profil inflammatoire, et favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs [225] ***(Figure 43)***. Le butyrate est le métabolite bactérien le plus étudié mais son rôle dans l'hypersensibilité viscérale reste controversé [195], [196]. Des études menées chez l'humain ont montré les effets analgésiques du butyrate à des concentrations physiologiques et dose-dépendante [226], alors que des études menées chez le rongeur lui ont attribué un effet pro-algésique via une induction de l'hypersensibilité viscérale [227], [228] ***(Figure 43)***. En plus de ses rôles dans l'inflammation, la fonction de barrière et l'hypersensibilité viscérale, le butyrate possède des effets sur la motilité du côlon [229]–[231], des effets bénéfiques sur les dommages à l'ADN causés par le stress oxydatif [232] et des effets anticancéreux dans le cancer colorectal [233] ***(Figure 43)***.

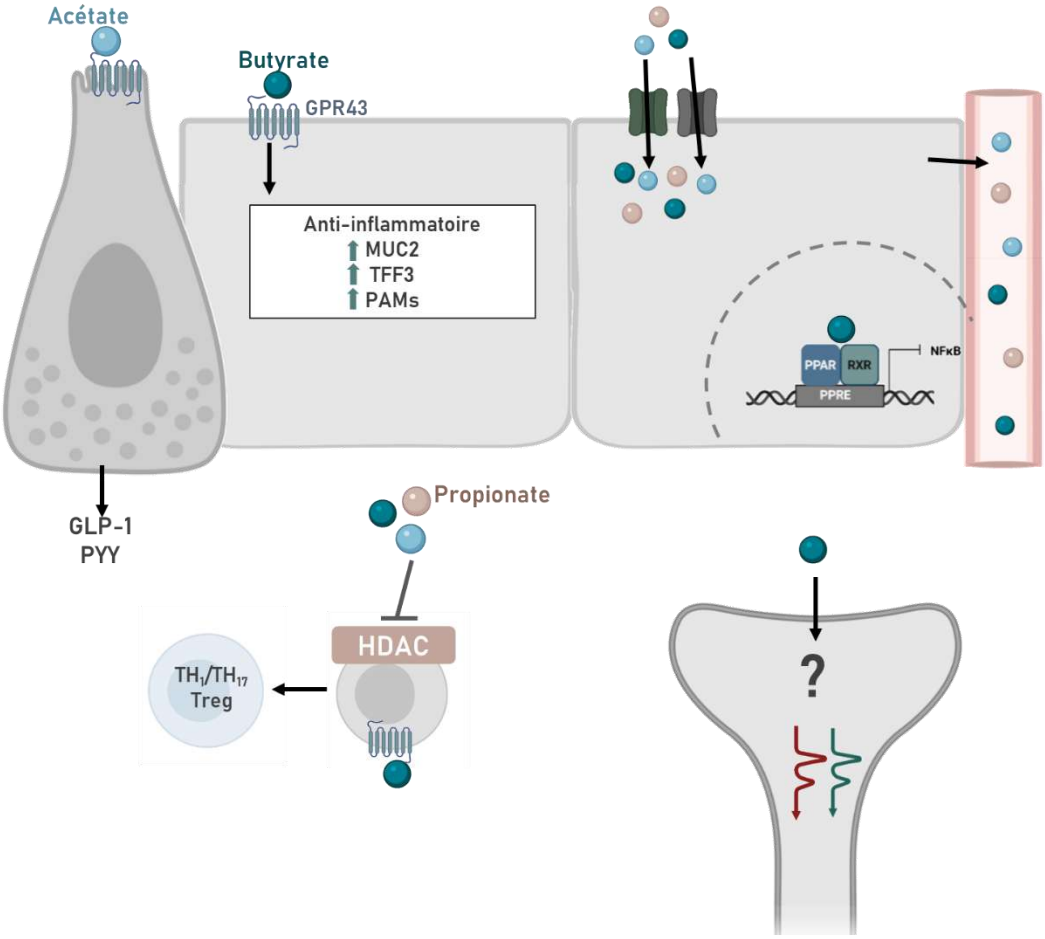


Figure 43 : Effets des acides gras à courte chaîne

2. Les lipides complexes

La sécrétion de lipides complexes par les bactéries du microbiote intestinal et leurs rôles restent moins étudiés que ceux des acides gras à courte chaîne. L'étude de métabolites appartenant aux acides gras beta-hydroxylés et aux lipopeptides a fait l'objet de mon projet de thèse.

a) Les acides biliaires secondaires

Les acides biliaires (AB) secondaires sont exclusivement produits par le microbiote intestinal à partir des acides biliaires primaires produits par l'hôte [32], [194], [209]. Les AB primaires (acide cholique (CA), acide chenodesoxycholique (CDCA) et acide bêta-muricholique) sont produits dans le foie à partir du cholestérol puis sont conjugués à de la glycine ou de la taurine. C'est sous cette forme conjuguée qu'ils sont transportés dans l'intestin grêle par la libération de la bile après un

repas. 95% des AB primaires sont réabsorbés par recirculation entéro-hépatique et les 5% restant sont métabolisés par le microbiote. Dans l'intestin grêle, ils sont déconjugués grâce à la bile salt hydrolase (BSH) exprimée par la majorité des bactéries. Les AB déconjugués atteignent le côlon où ils subissent des processus de déshydrogénation, déhydroxylation et épimérisation pour former les acides biliaires secondaires (acide lithocholique (LCA), acide désoxycholique (DCA) et acide ursodésoxycholique (UDCA)) [234]–[237] ***(Figure 44)***. Les bactéries du microbiote intestinal peuvent également reconjuguer les acides biliaires à de la tyrosine, de la leucine ou de la phénylalanine [234]. Les acides biliaires secondaires sont en partie réabsorbés et regagnent le foie où ils se fixent sur leurs récepteurs FXR et diminuent le métabolisme du cholestérol. Ils agissent localement sur le microbiote et modulent sa composition ou sur l'hôte via les récepteurs FXR et TGR5 [194], [234] ***(Figure 45)***.

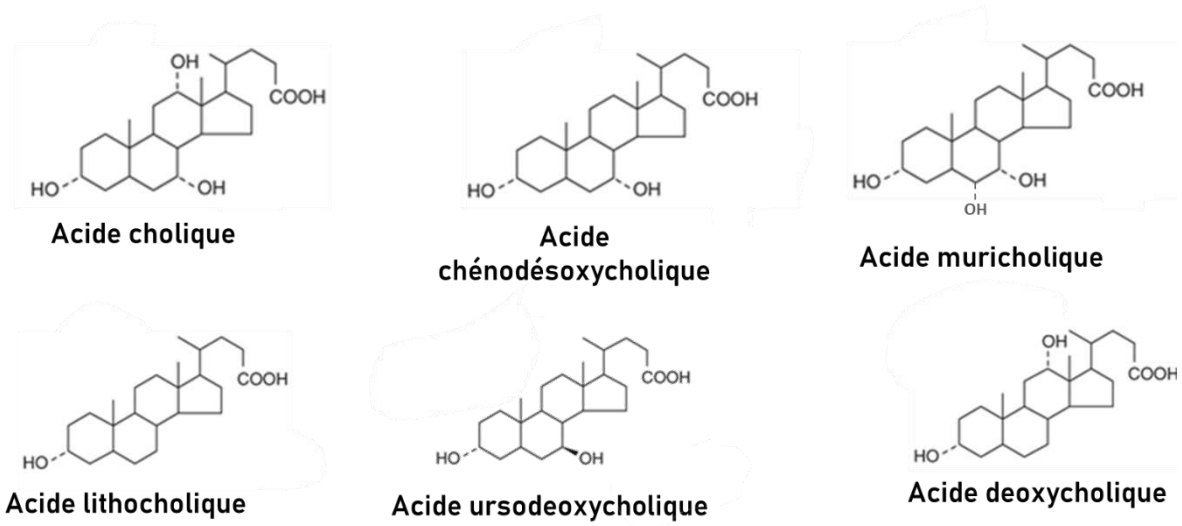


Figure 44 : Structure des acides biliaires primaires et secondaires

FXR est un récepteur nucléaire qui lie les AB primaires comme secondaires (CDCA > DCA > LCA > CA avec une affinité décroissante) [238]. L'activation de ce récepteur dans des modèles murins de colite diminue la sévérité de l'inflammation, la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1β et IL-6 par les macrophages et les cellules dendritiques, et l'expression de gènes pro-inflammatoires dans les CEI. TGR5 est un RCPG et peut aussi être activé par les acides biliaires primaires et secondaires (LCA>DCA>CDCA>UDCA>CA avec une affinité décroissante). Son activation diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires induite par

le LPS et diminue la sévérité de la colite *in vivo*. De plus, les acides biliaires secondaires augmentent la production d'IL-10 et la différenciation des lymphocytes T en T régulateurs leur confèrant une activité anti-inflammatoire [235], [239]. Une plus grande proportion d'AB secondaires dans l'intestin semble être bénéfique et induire une tolérance immunitaire alors que l'augmentation de la proportion d'AB primaires est délétère et favorise l'inflammation. Leur activité sur la barrière semble donc être différente en fonction de la proportion d'AB primaires et secondaires retrouvés dans la lumière [203]. Les AB primaires et secondaires ont également été identifiés comme délétères chez certains patients SII où leur mauvaise réabsorption pourrait être à l'origine de diarrhée. Enfin, le DCA active les afférences du côlon directement et indirectement via l'induction du relargage de sérotonine. [240]–[242] [243] ***(Figure 45)***.

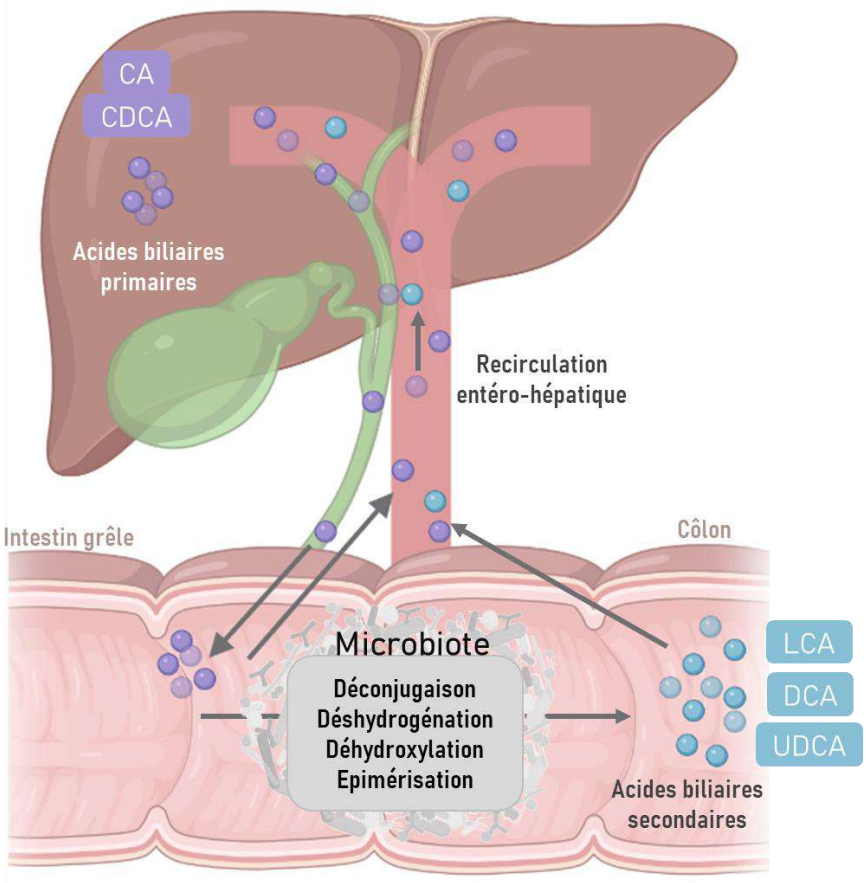


Figure 45 : Production des acides biliaires secondaires

b) Les dérivés des acides gras polyinsaturés

L'acide linoléique et l'acide oléique sont des acides gras polyinsaturés essentiels apportés par l'alimentation. Ces AG sont métabolisés par les bactéries du microbiote intestinal via la voie de biohydrogénation en acides gras hydroxylés : 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA), 10-hydroxy-trans-11-octadecenoic acid (HYC), 10-hydroxy-octadecanoicacid (HYB) grâce à des hydratases. Ils peuvent aussi être transformés en oxo-AG **:** 10-oxo-cis-12-octadecenoic acid (KetoA), 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC), 10-oxo-octadecanoic acid (KetoB). Ils peuvent aussi être métabolisés en isomères de position de l'acide linoléique nommés acide linoléique conjugué (CLA) et de l'acide oléique nommé acide 10(E)-octadécénoïque [244]–[246] [247], [248] ***(Figure 46)***.

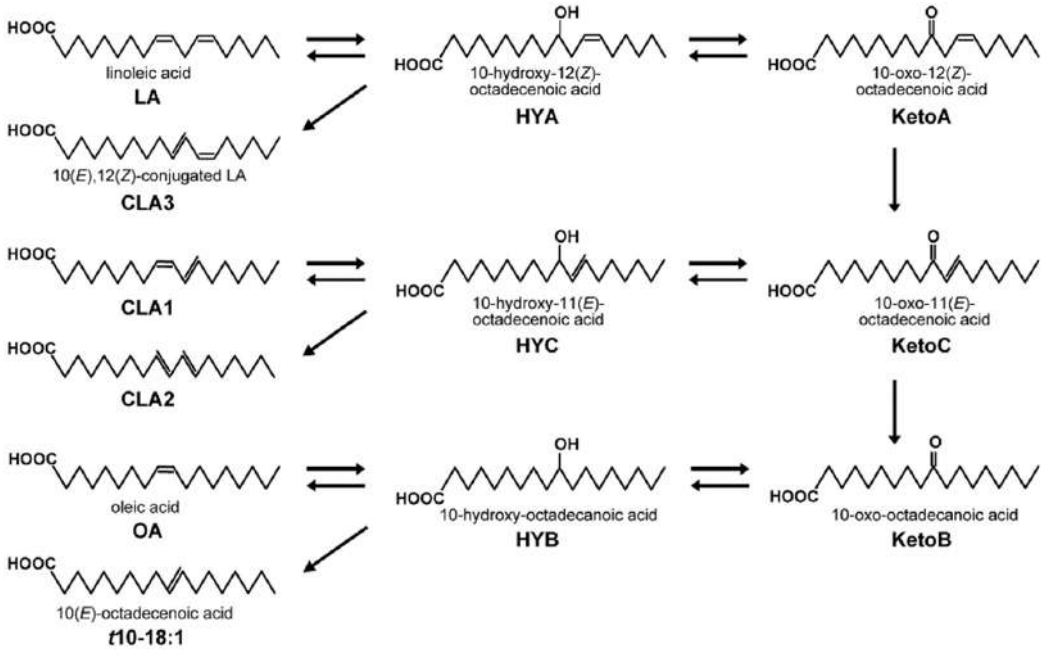


Figure 46 : Structure et formation des dérivés des acides linoléique et oléique

Goto et al. 2015 [248]

Ces molécules peuvent être produites par différents genres bactériens comme les *Bifidobacteria,* les *Enterobacter,* les *Lactobacillus* ou encore les *Clostridiums* [249], [203]. Encore peu étudiées, c'est majoritairement leur rôle dans l'inflammation intestinal qui a été exploré. HYA, et CLA sont anti-inflammatoires dans des modèles de colite induite par le DSS, HYA via GPR40 et CLA via PPARγ, alors que HYB n'a pas d'effet sur la colite [200], [245], [246]. Enfin, en 2019, un rôle protecteur contre l'obésité a aussi été attribué à HYA via sa fixation sur GPR40 et GPR120, ce qui entraîne la sécrétion de GLP-1 [247] **(*Figure 50)***.

c) Le lipide A

Le lipide A est l'un des composants du LPS avec le core d'oligosaccharide et le O-antigène. Il est présent dans la partie interne du LPS, lui-même enchâssé dans le feuillet externe de la membrane externe des bactéries à gram$^-$ ***(Figure 47)***. Il est composé d'un squelette de glucosamines disaccharides liées en β (1 -> 6) et hexa- ou hepta- acétylé et β-hydroxylées. Les chaînes acyles qui lui sont liées contiennent 8 à 18 atomes de carbone et sont organisées en chaînes acyles primaires estérifiées sur le monosaccharide et en chaînes acyles secondaires liées au groupe hydroxyle des chaînes primaires [250], [251] ***(Figure 47)***. Sa biosynthèse dans le cytosol est très conservée entre les bactéries bien que la longueur des chaînes acyles soit dépendante de l'espèce et des conditions environnementales [250], [251]. Le lipide A est responsable de la toxicité du LPS et sa composition module l'ampleur de la réponse immunitaire suite à sa fixation sur TLR4 et son corécepteur MD2 [252]–[254]. La fixation du LPS par le lipide A à MD2 active la signalisation par MYD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) ou TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β). L'activation de ce récepteur et de ses co-récepteurs active NFkB et IRF3 et entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-6 ou l'Il1-β [255]. I*n vivo,* le LPS induit de l'hypersensibilité viscérale en augmentant la production de prostaglandines, d'IL-6, de TNFα et d'Il1-β qui possèdent des récepteurs sur les neurones sensitifs ou directement via la présence de TLR4 sur les neurones sensitifs [196] ***(Figure 50)***. En revanche, la façon dont la composition de son lipide A influe sur cet effet et si elle a une importance est encore inconnue.

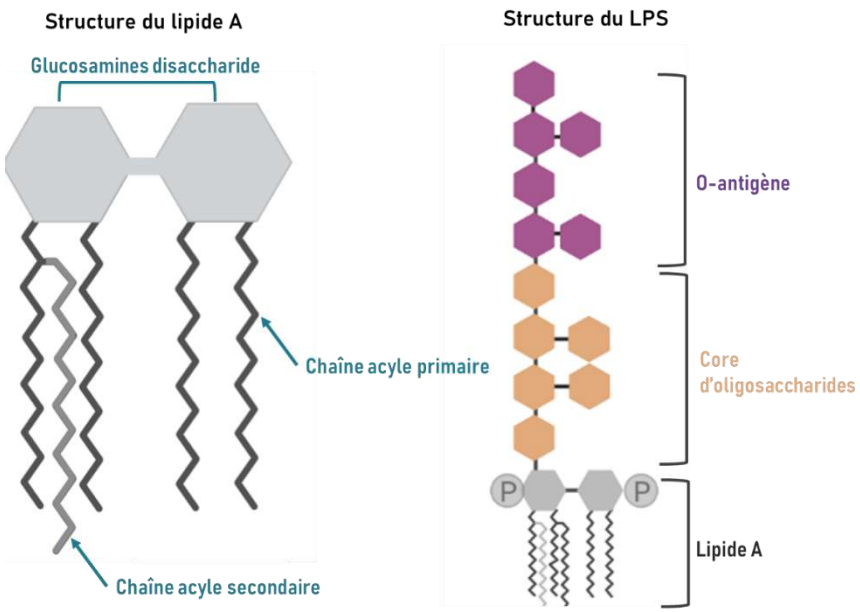


Figure 47 : Structures du lipide A et du LPS

d) Les acides gras β-hydroxylés

Peu étudiés, ces AG, hydroxylés en position 3 ou β, rentrent dans la composition du lipide A ***(Figure 48)***. C'est l'hydroxylation en position 3 qui permet la fixation des chaines acyles secondaires. Ils sont utilisés comme marqueurs de la présence d'endotoxines comme le LPS lors de suspicion d'infection par des Gram$^-$ [256]. Ils peuvent potentiellement provenir de la beta-oxydation ou de la voie de la fatty acid synthase pendant laquelle ils sont formés, liés à un acyl CoA qui est ensuite clivé par une thioesterase. Néanmoins, cette voie de synthèse n'a pas été clairement démontrée. Enfin, ils peuvent être formés grâce à une enzyme de la superfamille des CYP450, la CYP152A1. Cette enzyme bactérienne initialement identifiée pour son activité peroxygénase est également capable d'hydroxyler en position beta à 60% et alpha à 40% les acides gras [257], [258] [259]–[261] ***(Figure 49)***.

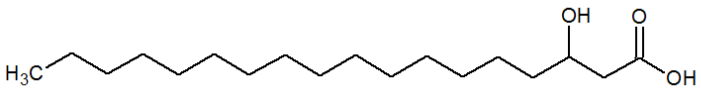
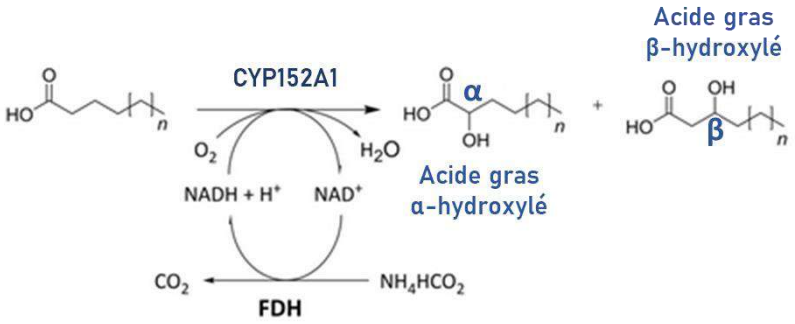


Figure 48 : Structure des acides gras β-hydroxylés, exemple du C18-3OH

A)



B)

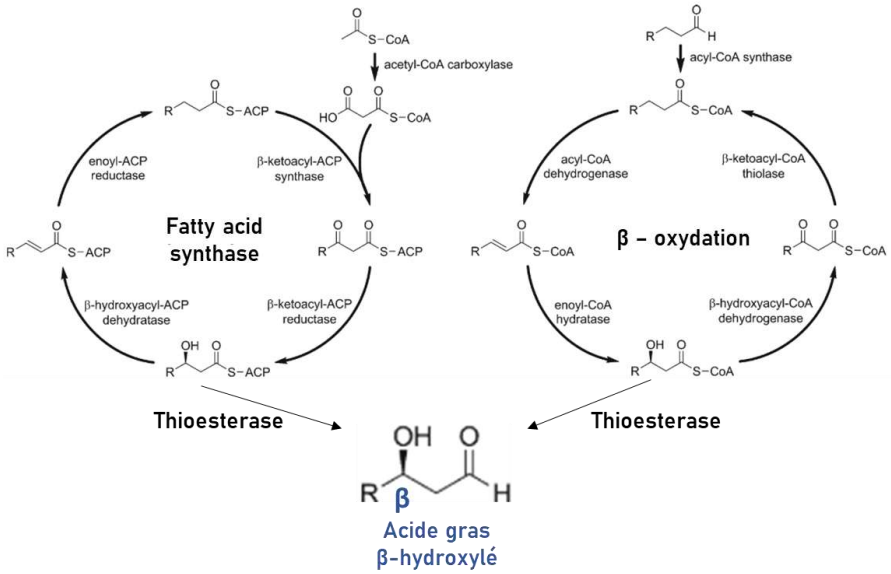


Figure 49 : Synthèse des acides gras β-hydroxylés

Adaptées de Cao et al. 2013 [257] *et de Hammerer et al. 2019* [258]

Schémas des différents mécanismes existants chez les bactéries pour produire des acides gras β-hyroxylés. A) Voie de la CYP152A1 B) Voies de la β-oxydation et de la Fatty Acid synthase

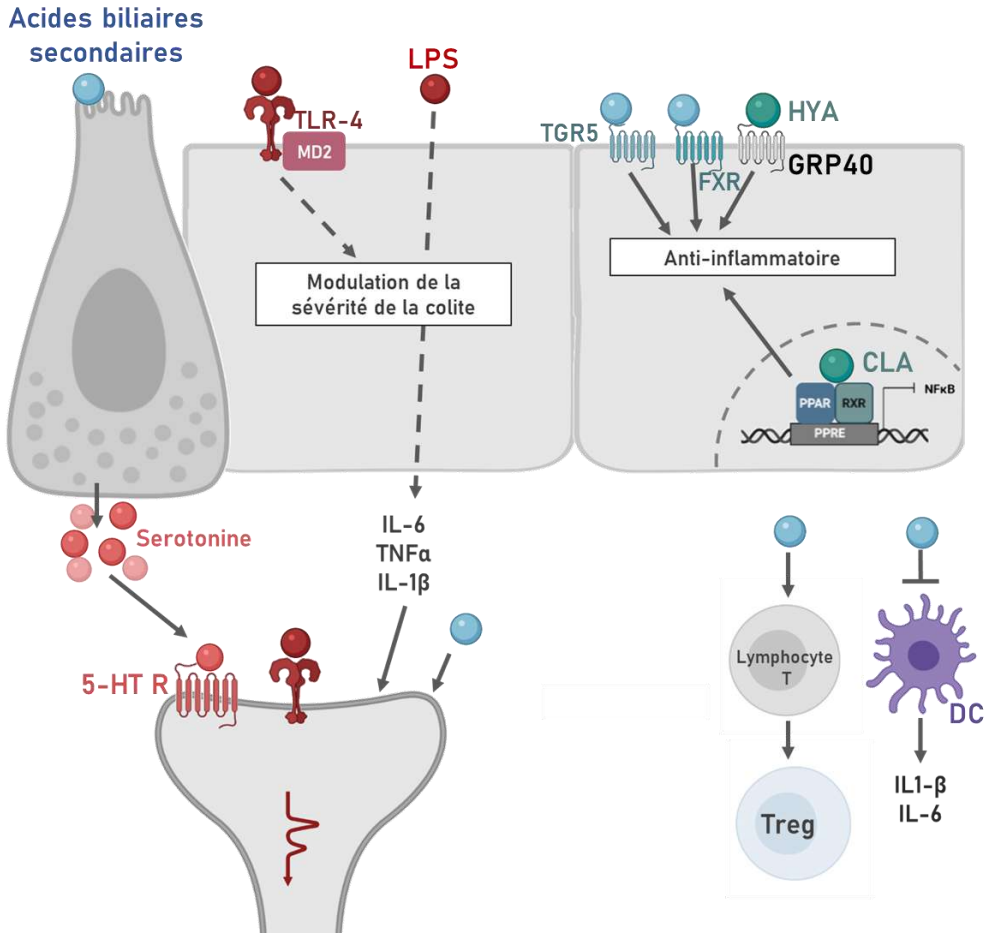


Figure 50 : Effets des acides biliaires secondaires, du LPS et des dérivés de l'acide linoléique

e) Les lipopeptides et aminolipides

- **Les commendamides et les N-acyl amides ou aminolipides**

Identifiés pour la première fois en 2015 par *Cohen et al.* dans le TD humain, les commendamides sont composés d'un acide gras hydroxylé et d'une liaison peptidique [262], [263]. Ressemblant fortement aux anandamides et aux endocannabinoïdes eucaryotes, ils sont produits par des bactéries commensales de l'intestin dont *B. vulgatus.* En se liant et en activant le GPR132 / G2A, ces lipides activent la voie de signalisation NFκB. En 2017, l'oleoyl-serinol a été décrit par la même équipe. Cette molécule composée d'un acide gras lié au sérinol, un analogue de la sérine, est un ligand du récepteur GPR119 [264]. Ces N-acyl-amides sont aussi des ligands des récepteurs aux endocannabinoïdes CB_1 et CB_2 qui inhibent la voie NFκB et diminuent l'activation de TRPV1 [197], [265], [266]. En 2021, *Chang et al.* [267] mettent en évidence

l'existence d'autres N-acyl-amides : le lauroyl tryptamine, le lineoyl tryptamine, l'oeoyl tryptamine, le docohexaenoyl tryptamine et l'alpha-linolenoyl tryptamine ***(Figure 51)*** produites par des *Clostridia*. Plusieurs études ont identifié des aminolipides constitués d'un acide gras et d'un acide aminé, comme le C12Asn ou le C14Asn, synthétisée par des PKS et des NRPS [268]–[270] ***(Figure 51)***.

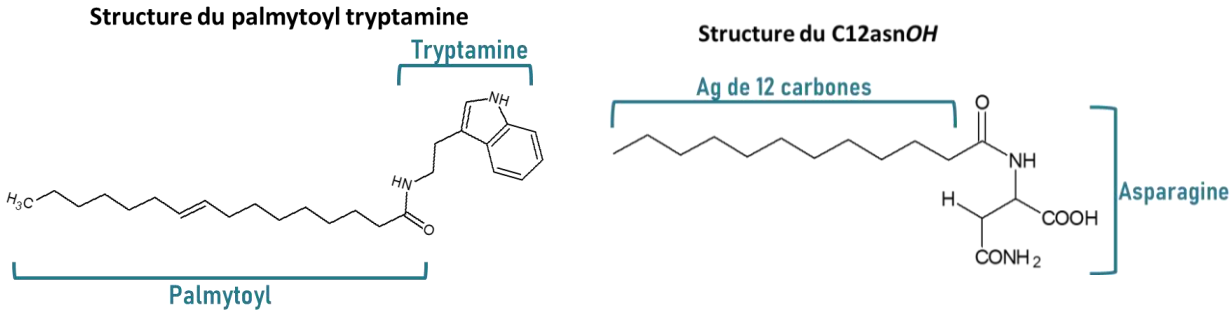


Figure 51 : Structure des commendamides et des aminolipides, exemples du palmytoyl tryptamine et du C12asnAOH

- **Les lipopeptides**

Les premiers lipopeptides décrits sont des molécules ayant des activités antibiotiques, antivirales et antifongiques [271]. La surfactine, l'iturine et la fengycine chez les *Bacillus* ou la syringomycine, la tolassine et l'arthrofactine chez *Pseudomonas* leur donnent un avantage compétitif face aux autres espèces bactériennes ou fongiques puisqu'elles inhibent leur croissance [271], [272] ***(Figure 52)***. Ces molécules sont formées par synthèse non ribosomale associant des peptides synthases non ribosomales (NRPS) et des polyketides synthase (PKS). Ces mégasynthases mutli-enzymatiques sont impliquées dans la synthèse de polycétides et de peptides non-ribosomaux qui ont pour la plupart des activités antibiotiques et antifongiques ***(Figure 52)***.

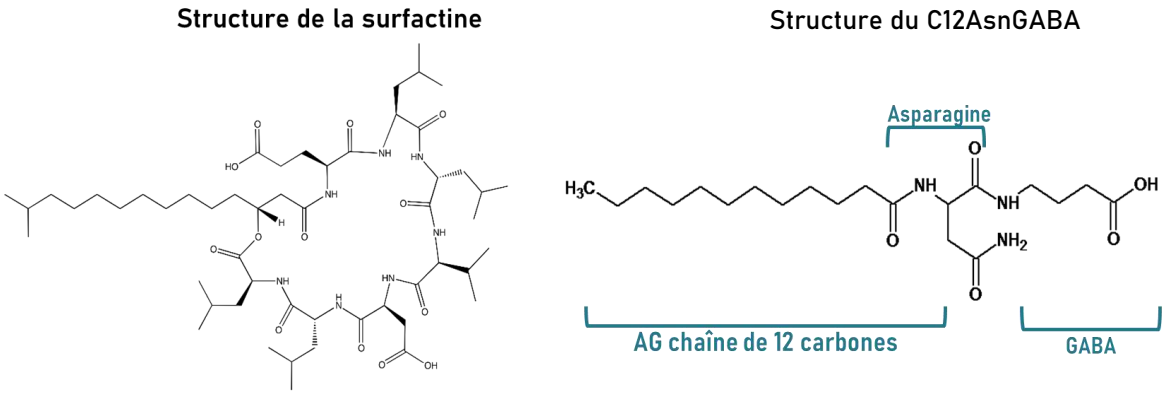


Figure 52 : Structure des lipopeptides, exemples de la surfactine et du C12AsnGABA

En 2017, l'équipe a identifié, par analyses comparatives des chromatogrammes de spectrométrie de masse d'EcN sauvages ou mutées, que cette bactérie produit des lipopeptides composés d'une chaine alkyle liée par une liaison peptidique à un seul acide aminé. Cet acide aminé est lui-même lié via une liaison peptidique à l'acide γ-amino butyrique ou l'acide β-amino butyrique : les C12asnGABA *et* C12asnBABA [207] ***(Figure 52)***. La production de ces molécules est dépendante d'au moins 3 gènes de l'îlot pks : ClbA, ClbB et ClbN. Le C12asnGABA inhibe l'activation des neurones sensitifs via le récepteur $GABA_B$ et contrairement au GABA seul, il est capable de traverser l'épithélium intestinal pour exercer ses effets analgésiques ***(Figure 53)***.

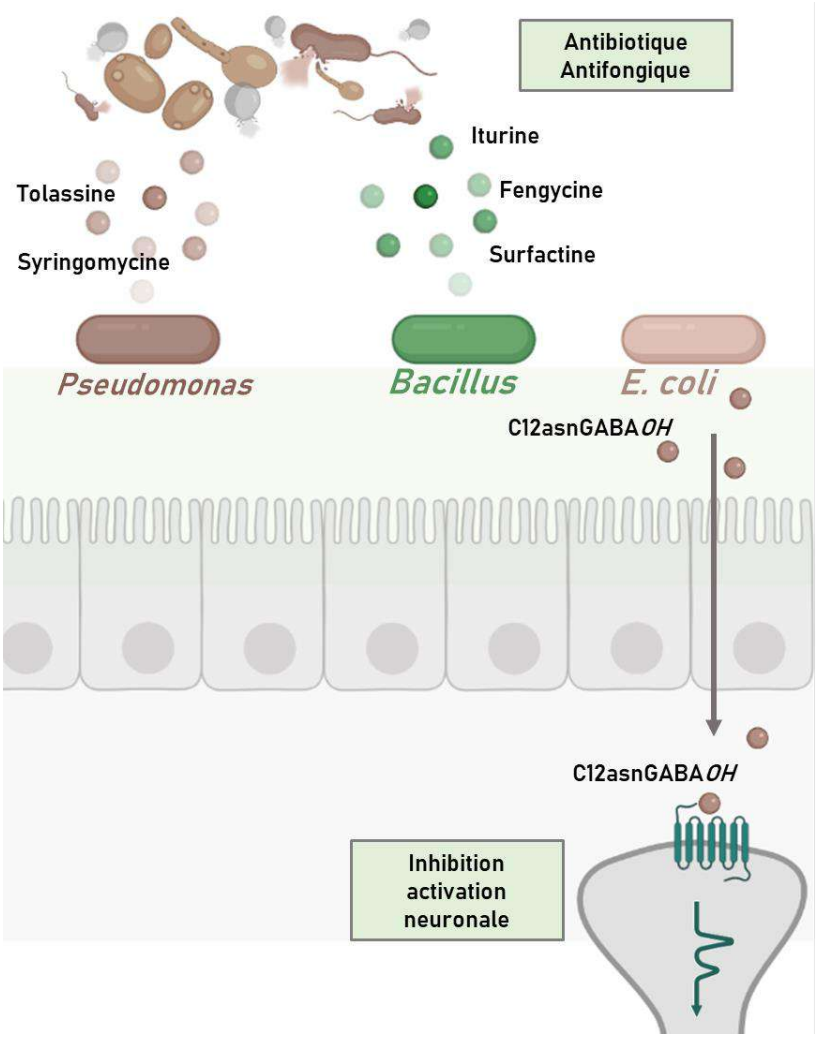


Figure 53 : Effets des lipopeptides

L'îlot pks est un cluster de gène, initialement identifié chez *E. coli,* et contient 19 gènes qui codent pour des PKS (ClbC, ClbI, ClbO), pour des NRPS (ClbH, ClbJ, ClbN) et pour des enzymes hybrides PKS/NRPS (ClbB et ClbK), ainsi que des protéines accessoires (ClbD, ClbE, ClbF, ClbG, ClbL, ClbQ, ClbM, ClbP, ClbR et ClbS). Plusieurs molécules sont produites par cet îlot comme, par exemple, la colibactine qui est un génotoxique impliqué dans les cassures double brin de l'ADN [273]. Depuis, la présence de cet îlot pks a été étendu à d'autres *Enterobacter (**Figure 54)**.*

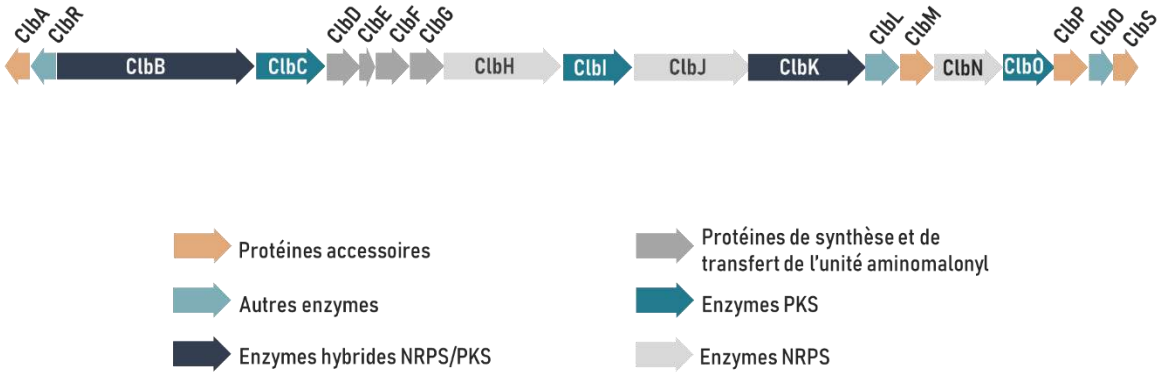


Figure 54 : Structure de l'ilot pks

Adaptée de Faïs *et al. 2018* [273]

L'étendue des métabolites lipidiques produits par le microbiote intestinal et leurs enzymes non retrouvées chez les eucaryotes reste encore à explorer. Par exemple, en 2020, ont été identifiés les short-chain fatty acid esters of hydroxy fatty acids (SFAHFAs) qui sont des acides gras à courte chaîne (acétate ou propionate) estérifiés par un acide gras hydroxylé d'une taille inférieure à 20 atomes de carbone [274] et en 2021, les AAFAHs (acyl alpha-hydroxyl fatty acid) composés d'AGCCs estérifiés par une longue chaîne de carbone (C22 à C26) [194] ***(Figure 55)***. Ces deux groupes de lipides ont encore des effets non identifiés. La diversité des métabolites produits par le microbiote intestinal lui permet de communiquer avec l'hôte localement, au niveau de l'intestin, mais aussi à distance avec d'autres organes comme le foie, le tissu adipeux ou le cerveau. La communication n'est pas unidirectionnelle et l'hôte peut également influer sur le microbiote et son métabolisme. Cette communication établie un axe microbiote – intestin – cerveau important dans la physiopathologie de l'hôte.

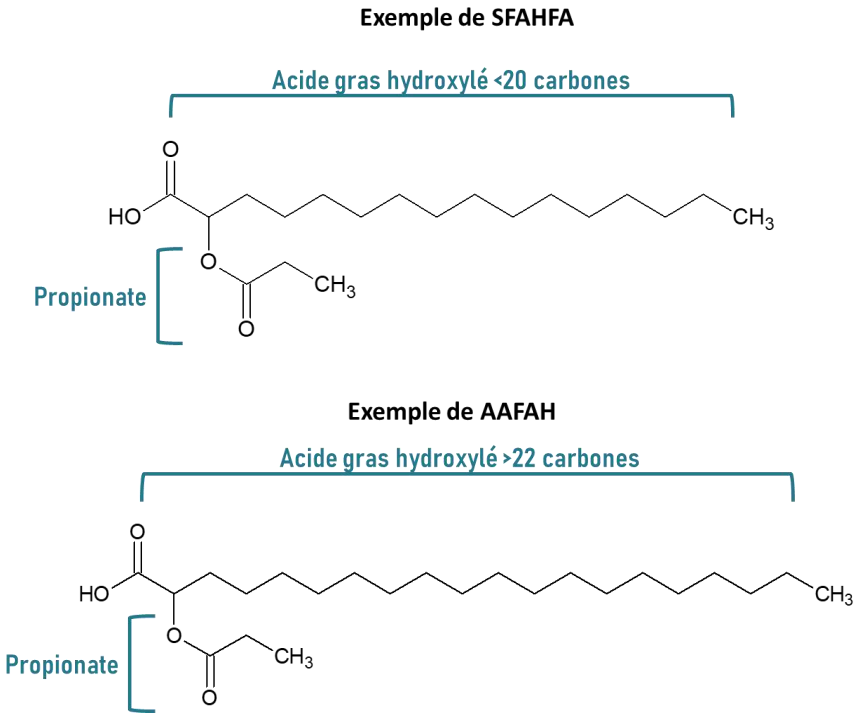


Figure 55 : Structure des SFAHFA et AAFAH

Chapitre 4 : L'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau et impact du stress chronique

I. L'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau

A. Historique & généralités

La découverte de l'axe intestin ↔ cerveau débute durant la seconde moitié du 18ème siècle et devient un sujet de recherche populaire au cours du 19ème siècle. En 1765, Robert Whytt, médecin à Edimbourg, développe le concept de « sympathie nerveuse » décrivant l'interconnexion par le système nerveux des organes internes et notamment de l'intestin où il observe une abondance de terminaisons nerveuses [275]. La bidirectionnalité de cette communication est proposée en 1829 par John Abernethy dans son « code Abernethien pour la santé et la longévité ». Dans cet ouvrage, il lie toutes les pathologies mentales et corporelles au dérèglement gastrique et inversement. Il décrit que des « conditions émotionnelles », comme l'anxiété excessive, entraînent une diminution de l'appétit suggérant une relation privilégiée entre l'intestin et le cerveau via le système nerveux [275]. Quatre ans plus tard, William Beaumont, chirurgien de l'US army, décrit la digestion *in vivo,* en observant Alexis St Martin, un trappeur blessé par balle à l'abdomen. La blessure ayant perforé l'estomac et ne se refermant pas, Beaumont y installa une fistule et enregistra plus de 200 observations chez son « patient ». Les premières études furent menées sur les processus de digestion en conditions basales, puis sur les effets des émotions et des variations environnementales sur la digestion. Les travaux menés durant ce siècle par la communauté scientifique insistent sur les liens entre troubles intestinaux et troubles psychologiques. Ils font même l'objet d'œuvres de fiction comme « Les mémoires d'un estomac », publiées en 1853 par Sydney Whitting, qui raconte la vie quotidienne du personnage principal du point de vue de son estomac. Cette attention est particulièrement vraie dans la santé des femmes dont les intestins sont considérés comme faibles, à l'image des femmes elles-mêmes, et créant plus souvent de l'anxiété, de la peur et de l'agitation que chez les hommes. Bien que très genrés, ces travaux posent les bases de l'axe intestin ↔ cerveau [275]. Metchnikoff ajoute le microbiote dans cet axe. En étudiant l'auto-intoxication qui induit de la mélancolie et de la fatigue, il décrit l'impact bénéfique de bactéries du lait fermenté sur ces symptômes et donc la communication microbiote ↔ intestin ↔ cerveau [276], [277].

Les études réalisées plus récemment ont confirmé l'existence et l'importance de cette communication bidirectionnelle entre le microbiote, l'intestin et le cerveau. L'utilisation et l'étude des souris axéniques ont montré que la perte du microbiote dans ce dialogue, en plus d'impacter l'intestin comme discuté dans les chapitres 1 et 2, impacte des mécanismes centraux. En effet, les souris axéniques présentent, entre autres, une altération de l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HHS), responsable de la gestion du stress, de la biochimie du cerveau et du comportement affectif [278]. Les dysbioses du microbiote intestinal ont été associées à de nombreuses pathologies extra-intestinales comme les troubles du spectre autistique, l'anxiété, la dépression ou la maladie d'Alzheimer dans des modèles animaux et chez l'humain. Les souches bactériennes et les mécanismes impliqués dans ces interactions n'ont pas été identifiés. Néanmoins, une amélioration des symptômes est observée en préclinique par utilisation d'antibiotiques ou de probiotiques qui modifient la composition du microbiote intestinal. Enfin, le transfert fécal de souris anxieuses ou de patients anxieux à des souris, entraîne l'apparition de comportement anxieux chez ces animaux. Bien qu'il soit difficile d'établir si la dysbiose est une cause ou une conséquence de ces pathologies, ces observations démontrent que le microbiote est, *a minima*, impliqué dans la persistance des symptômes [105], [276], [277], [279]–[284], [285].

B. Mécanismes impliqués

Grâce aux différentes stratégies permettant de moduler le microbiote, les études portant sur l'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau dans la physiologie de l'hôte sont nombreuses. Trois grandes voies de communication ont été décrites : humorale, nerveuse et immunitaire **(*Figure 56)***. Certains métabolites bactériens décrits dans le troisième chapitre de ce manuscrit traversent la barrière épithéliale intestinale et se retrouvent dans la circulation sanguine, leur permettant d'avoir des effets à distance de l'intestin. Par exemple, comme les neurones et les cellules immunitaires expriment des récepteurs à l'acétylcholine, au GABA, à la sérotonine ou à la dopamine, ces molécules produites par le microbiote pourraient avoir des effets sur ces populations cellulaires [281], [283], [286], [287]. L'innervation intestinale intrinsèque et extrinsèque participent également à la communication entre le cerveau et l'intestin. L'innervation intrinsèque contrôle la motilité et les sécrétions intestinales et est sous le contrôle du SNC et du microbiote. Par exemple, les souris axéniques présentent des anomalies de la

structure et de la neurochimie du système nerveux entérique intrinsèque qui sont restaurées après colonisation. Concernant l'innervation extrinsèque, elle est également bidirectionnelle. Par exemple, le nerf vague transmet des informations de l'intestin vers le tractus solitaire, une région du cerveau qui régule directement l'axe HHS. Il module la motilité et les sécrétions de l'intestin influant ainsi l'environnement du microbiote et donc sa composition. Dans les modèles animaux d'anxiété et de dépression, la section du nerf vague inhibe les effets bénéfiques des probiotiques. En revanche, les modifications du comportement engendrées par une dysbiose sont inaffectées par la vagotomie. Ces résultats montrent que les mécanismes de communication de l'axe « microbiote ↔ intestin ↔ cerveau » sont multiples, simultanés, mais aussi, pour certains, encore inconnus [277], [281], [288], [285], [289].

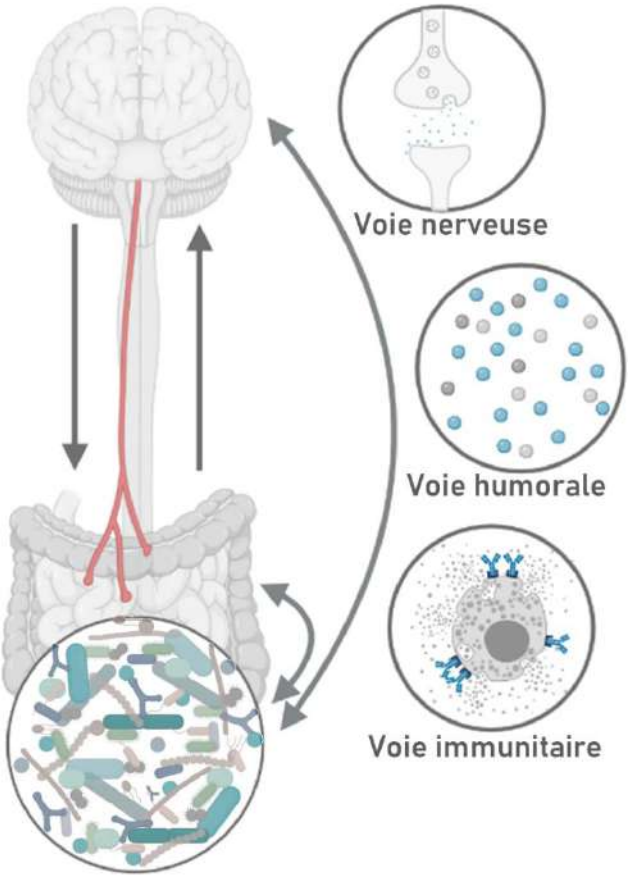


Figure 56 : L'axe microbiote ↔ intestin ↔ cerveau

II. Le stress chronique

A. Historique

Le concept de stress est apparu au début du 20ème siècle et a été formulé sans utiliser le terme de stress par Walter B Cannon. Il développa les concepts d'homéostasie et d'hormones d'urgence qui répondraient aux perturbations extérieures. Il fut le premier à inclure des aspects psychologiques à cette réponse [290]. Dans les années 30, Hans Selye, considéré comme le fondateur du concept moderne du stress, propose la notion du syndrome d'adaptation général qu'il renommera plus tard « stress ». Il suit deux grandes idées : le stress est une réponse physiologique, et il est non spécifique de la menace rencontrée [290] [291].

B. Généralités & définitions

Le stress est défini comme étant la réponse à toute menace externe, ou évènement perçu comme tel, qui altère l'homéostasie. Ces menaces sont ressenties différemment en fonction des expériences personnelles, des facteurs génétiques et épigénétiques de chaque individu [280], [286], [292]. Le stress aigu est une réponse bénéfique et adaptative de l'organisme pour restaurer rapidement l'homéostasie. Il prépare la réponse « fight or flight » en sécrétant les hormones de l'axe du stress libérant ainsi les stocks d'énergie utilisables immédiatement par le cerveau et le système musculosquelettique. En parallèle, il diminue les activités non essentielles comme la digestion, la croissance ou encore l'activité sexuelle [286], [293], [294]. En revanche, le stress chronique, auquel nous nous intéresserons durant nos travaux, est inadapté et néfaste. En effet, l'incapacité à réagir de façon mesurée au stress est associée au développement et à la sévérité de certaines maladies comme le SII, l'anxiété et la dépression [295], [293], [296], [297]. Pendant la réponse au stress, deux voies majeures sont activées : l'axe HHS qui s'active dans les minutes suivant le stress et le système nerveux sympathique qui s'adapte en quelques secondes [298].

C. Les axes du stress

1. L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HHS)

a) Description

L'axe HHS est un axe neuroendocrine impliquant le noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et le cortex surrénalien [299]. Le NPV contient des neurones synthétisant de la corticolibérine ou corticotropin-releasing hormone (CRH). Cette hormone agit sur l'hypophyse antérieure où elle stimule la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). L'ACTH passe dans la circulation sanguine et active la production de glucocorticoïdes par le cortex de la glande surrénalienne. Les glucocorticoïdes (GC) effectuent un rétrocontrôle négatif sur la production de CRH et d'ACTH et régulent l'axe HHS [276] **(*Figure 57)***. Cet axe a un rôle central dans le maintien de l'homéostasie métabolique, cardiovasculaire, reproductive et nerveuse de l'organisme, mais aussi dans la communication avec le microbiote [277]. Il est modulé par différents facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux dont l'exposition au stress et son activation est inhibée par différents neurotransmetteurs comme le GABA, la sérotonine et la noradrénaline [300], [301], [299].

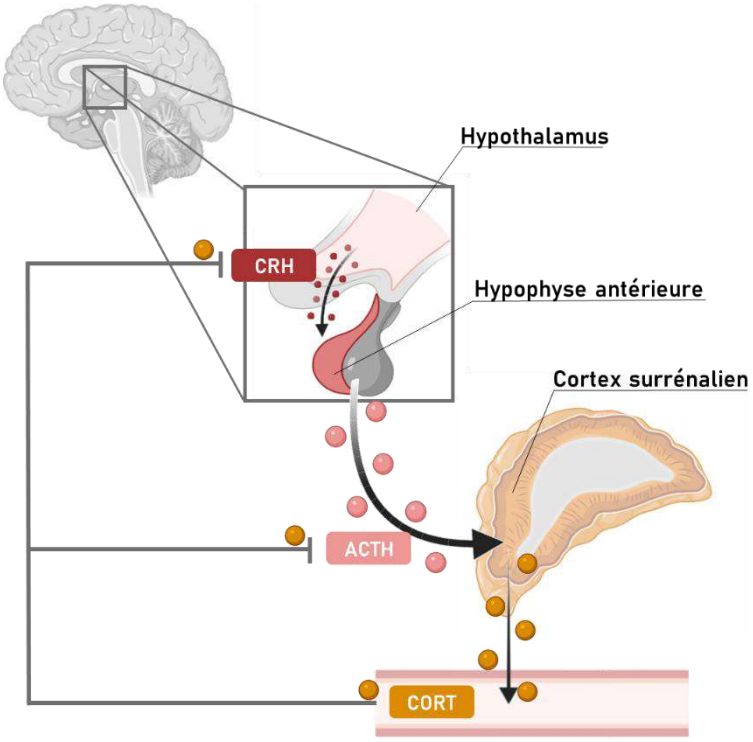


Figure 57 : Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien

b) Les hormones de l'axe HHS

La CRH est, à la fois, un neurotransmetteur et une neurohormone produite par l'hypothalamus au niveau central et en périphérie par les cellules du système immunitaire, les cellules entérochromaffines, le système nerveux sympathique et les cellules intestinales [302] **(*Figure 58)***. Ses deux récepteurs, CRFR1 et CRFR2 (Corticotropin-releasing factor receptor), sont notamment exprimés au niveau du côlon chez les mammifères [303]. A court terme, elle entraîne une diminution de l'appétit, une augmentation de l'anxiété et de l'attention. Au niveau intestinal, la CRH module le système nerveux intrinsèque et augmente la motilité intestinale [302].

L'ACTH est une hormone pulsatile à rythme circadien **(*Figure 58)***. Ses pics précèdent ceux du cortisol dont la concentration maximale est atteinte avant le réveil et la concentration minimale avant la phase de sommeil. Lors de sa sécrétion, l'ACTH augmente la biodisponibilité du cholestérol dans le cortex surrénalien ce qui augmente la production d'hormones stéroïdiennes. Elle participe aussi à l'augmentation de la transcription des gènes codant pour les enzymes impliquées dans cette voie métabolique. Son récepteur MC2R (Melanocortin 2 Receptor) est fortement exprimé au niveau des glandes surrénales.

Les GC sont des hormones stéroïdiennes essentielles à la survie de l'organisme. Elles sont principalement représentées par la corticostérone chez la souris et le cortisol (CORT) chez

l'humain [300] **(*Figure 58)***. Le taux de cortisol dans le sang suit un rythme circadien. Sa concentration atteint un pic 30 à 45 minutes après le réveil, diminue graduellement au cours de la journée pour réaugmenter en fin d'après-midi avant de diminuer de nouveau pour atteindre son niveau le plus bas pendant la nuit. La perte de ces variations journalières est associée à certaines maladies comme l'insomnie, l'obésité ou les maladies cardio-vasculaires [304]. En cas de réponse adaptée à un stress, l'augmentation de cortisol est transitoire, rapide, et diminue avec la fin de l'évènement stressant. En revanche, lors d'une réponse inadaptée à un stress chronique, le taux de cortisol reste élevé et entraîne des effets systémiques comme de l'hypertension, une immunosuppression ou une altération de l'homéostasie intestinale [300]. Le cortisol est un ligand de haute affinité des récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et de faible affinité pour les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). Ainsi, les MRs participent au tonus basal de cortisol alors que les GRs sont plutôt activés lors d'un stress et de l'augmentation de la concentration de cortisol [300], [301], [305]. Ces récepteurs sont exprimés dans la majorité des tissus, ce qui permet au cortisol d'avoir un effet systémique.

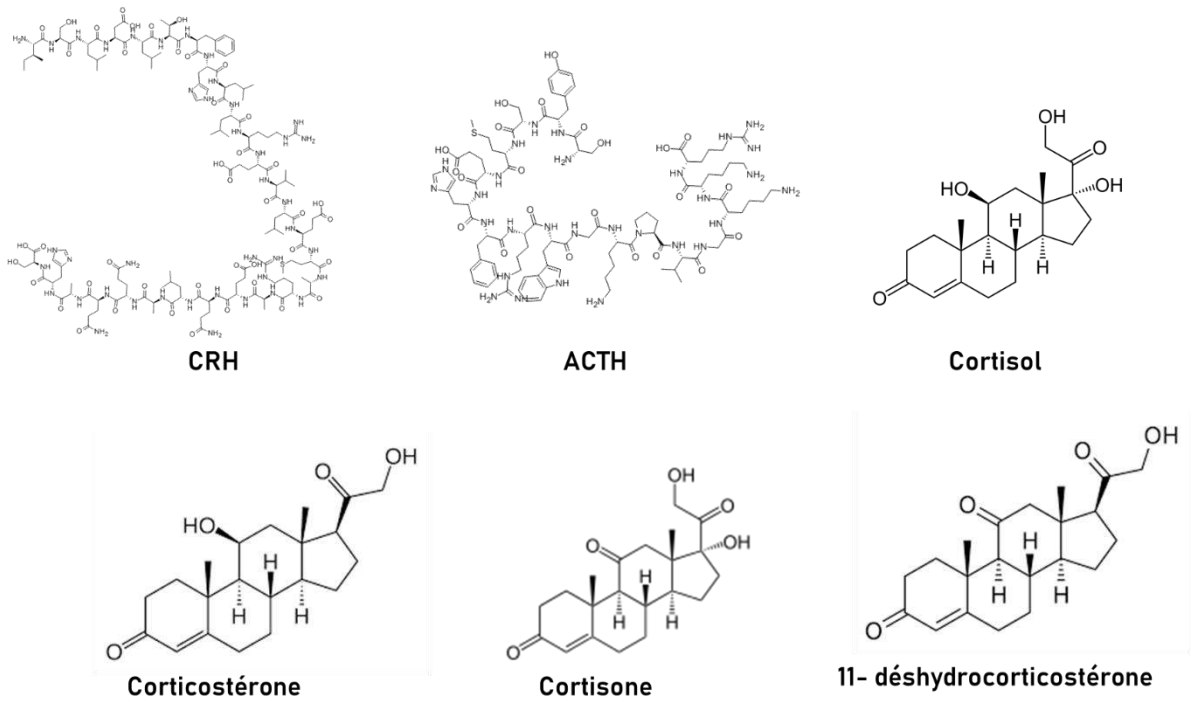


Figure 58 : Les hormones de l'axe HHS

c) Différences hommes/femmes

Aucune différence anatomique systématique du NPV n'a été observée entre les hommes et les femmes. Cependant, l'activation de l'axe HHS entraîne une libération d'ACTH et de cortisol plus importante chez les femmes que chez les hommes. La régulation de ces deux hormones est plus lente chez les femmes, ce qui maintient leur présence dans le sang à des concentrations élevées plus longtemps. Ces différences s'expliquent en partie par la régulation de l'axe HHS par les hormones sexuelles. La testostérone inhibe la production de cortisol alors que les œstrogènes l'augmentent et inhibent le rétrocontrôle inhibiteur [299], [301].

d) Développement

La CRH est synthétisée par le placenta et semble déterminer en partie la durée de gestation. Ses taux augmentent vers la fin de la grossesse ce qui stimule la production de prostaglandines nécessaires aux contractions utérines pendant l'accouchement. Pendant la grossesse, le taux plasmatique de cortisol maternel augmente de 2 à 3 fois au dernier trimestre et déclenche la production de surfactant pulmonaire nécessaire à la respiration fonctionnelle du nouveau-né. Le taux de cortisol fœtal reste 13 fois inférieur à celui de sa mère grâce à la 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase type 2 (11β-HSD2) placentaire qui inactive 80% du cortisol et de la corticostérone en les métabolisant en cortisone chez l'humain et en 11-déshydrocorticostérone chez la souris [301], [306]–[308], [305], [309]–[311] **(*Figure 58)***. L'axe HHS du fœtus est immature jusqu'au 3ème trimestre de grossesse où le fœtus devient capable de produire et de sécréter lui-même de la CRH et de l'ACTH ce qui stimule sa production de cortisol [311] **(*Figure 59)***. Après la naissance, les taux d'ACTH et de cortisol du nouveau-né diminuent et il entre dans une phase d'hypo-réponse au stress de durée variable en fonction des espèces [311]. Chez la souris cette période s'étend du 2ème au 14ème jour de vie tandis que chez l'humain, elle se termine au moment de la puberté. Elle est maintenue, au moins chez les rongeurs, par les interactions affectives entre la mère et l'enfant [312]–[314]. Pendant la période néonatale, la glande surrénale est particulièrement sensible à de petites quantités d'ACTH alors que le système de rétrocontrôle négatif n'est pas encore mature, ce qui entraîne une réponse exagérée au stress [315].

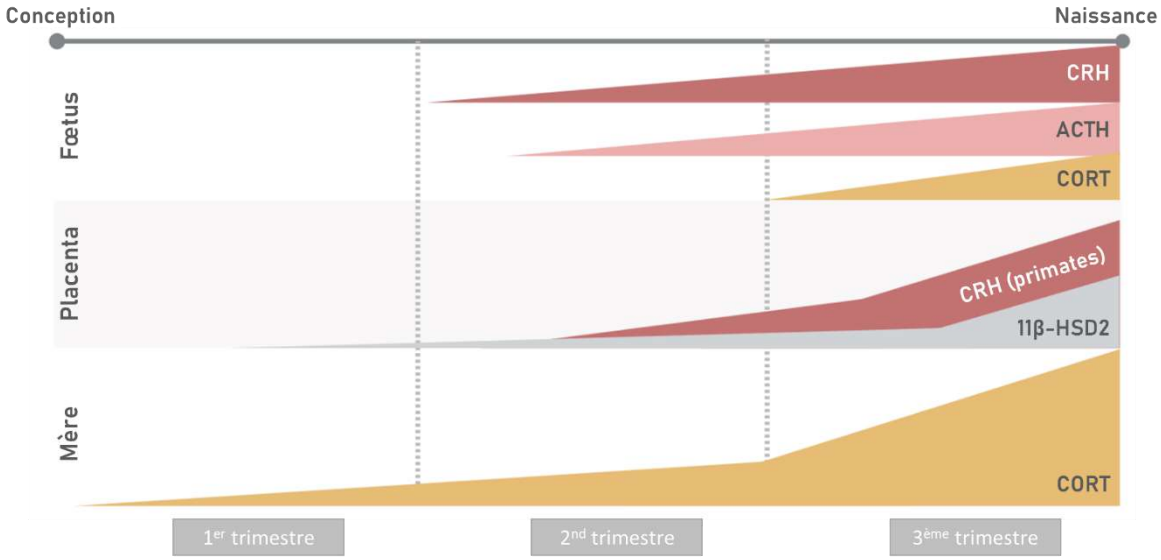


Figure 59 : Variations de l'axe HHS pendant la grossesse

Adaptée de Howland et al. 2017 [305]

2. Le Système nerveux sympathique (SNS)

L'activation du système nerveux sympathique qui projette dans la majorité des organes, libère des catécholamines, adrénaline et noradrénaline au niveau de la médulla surrénalienne [298] ***(Figure 60 & 61)***. Ce système créé une boucle de régulation positive avec l'axe HHS. Les catécholamines stimulent la production d'ACTH et de CRH et la corticostérone stimule la production d'adrénaline et de noradrénaline. Les neurones produisant du CRH ont des projections dans les centres adrénergiques du tronc cérébral et de la moelle épinière où l'activation des récepteurs α1 adrénergiques stimule le système sympathique et l'activation des récepteurs α2 adrénergiques inhibe le système parasympathique amplifiant l'activation [316]. Les catécholamines possèdent des effets systémiques et lors d'un stress chronique, elles participent à la modulation du système immunitaire en favorisant une réponse Th2 et augmentent la virulence de bactéries pathogènes [298], [317], [316].

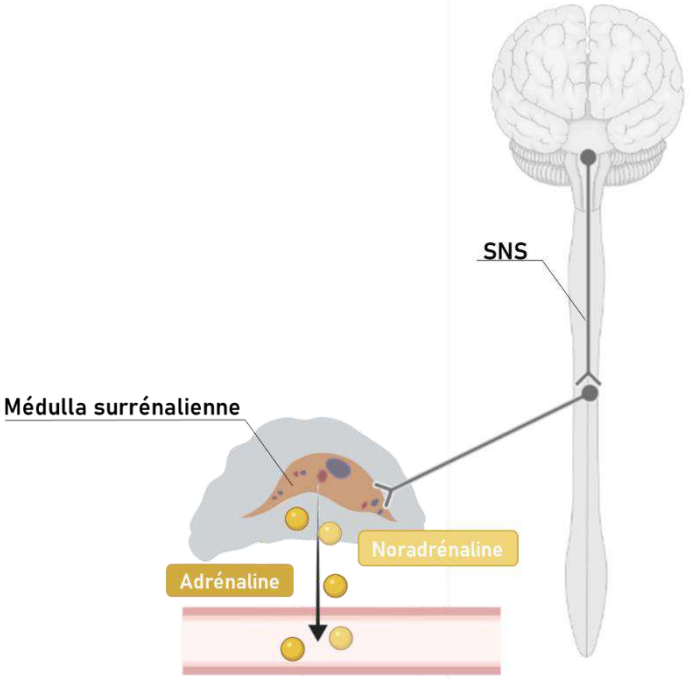


Figure 60 : L'axe du système nerveu sympathique

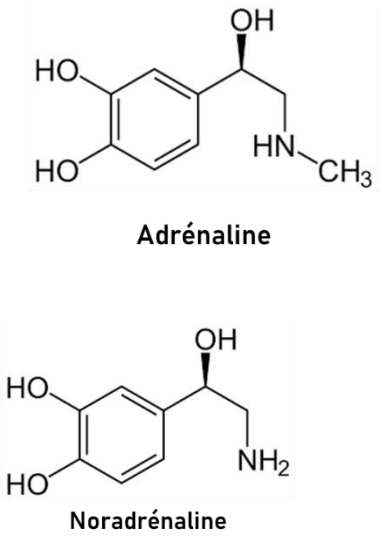


Figure 61 : Les hormones de l'axe du SNS

III. Le stress chronique et le tractus digestif

A. L'âge adulte

Les modèles de stress chronique chez la souris et chez le rat ont permis d'établir que le stress impacte négativement l'axe HHS, le tractus digestif et le microbiote intestinal. La réponse au stress peut également être modulée en modifiant la composition du microbiote. Les premières observations de l'impact du stress chronique sur le microbiote ont été réalisées chez la souris dans les années 70 par Gerald Tannock. Après avoir placé ses souris dans des cages sans eau, sans litière et sans nourriture, il observa une dysbiose du microbiote intestinal caractérisée par une diminution des *Lactobacillus.* Bien que drastiques et impactant également fortement le métabolisme énergétique de la souris, ces premières expériences ont permis de montrer le lien entre stress et microbiote [298]. Depuis, de nombreuses études ont confirmé l'impact du stress sur la diminution de la richesse et de la diversité bactérienne, la diminution de l'abondance des *Lactobacillus* et l'augmentation de l'abondance d'autres genres comme les *Akkermansia.* Les effets sur la composition du microbiote sont parfois transitoires, mais dans les quelques études

ayant analysé la fonction du microbiote, les changements métaboliques persistent au-delà des changements taxonomiques [295], [318]. Chez les rongeurs, l'augmentation de la perméabilité intestinale paracellulaire induite par le stress est abolie par un prétraitement avec des antagonistes périphériques des récepteurs à la CRH [286], [302], [318], [319]. Cette hormone participe aussi à la diminution du nombre de cellules caliciforme dans le côlon distal observée après un stress, en favorisant leur apoptose [320]. L'hypersensibilité viscérale induite par le stress chronique est également diminuée par des antagonistes périphériques des récepteurs à la CRH, mais pas par des antagonistes centraux [286], [321].

L'importance du microbiote dans la régulation de la réponse au stress a été montrée grâce à l'étude du comportement et de la physiologie des souris axéniques. En condition basale, les souris axéniques et contrôles ont des taux d'hormones de l'axe HHS similaires. En condition de stress, les souris dépourvues de microbiote ont une réponse exagérée définie par une augmentation de corticostérone et d'ACTH supérieure à celles des souris contrôles. Après un stress chronique, les souris présentent également une augmentation des comportements anxieux et dépressifs [322]. La colonisation de ces souris par une bactérie probiotique, *Bifidobacterium infantis,* limite les effets du stress. A l'inverse leur colonisation par une *E. coli* pathogène les aggrave [276], [323]. Malgré ce seuil inférieur de réponse au stress, les souris axéniques présentent moins de comportements anxieux et dépressifs que les souris contrôles en conditions basales [287], [319]. Dans les modèles murins d'anxiété et de dépression, les symptômes sont diminués après un traitement antibiotique ou probiotique contenant des *Lactobacillus ou encore Bifidobacterium longum* renforçant le rôle du microbiote dans la régulation de l'axe HHS [286], [319]. Ces effets bénéfiques sont dépendant du nerf vague puisqu'une vagotomie inhibe les effets bénéfiques des probiotiques [287].

Bien que des études précliniques montrent que le stress chronique impacte fortement la composition du microbiote et l'homéostasie intestinale, ce lien de causalité est difficile à définir chez l'humain car il est difficile d'établir des cohortes permettant de suivre les mêmes patients avant et pendant un stress chronique [277]. Les études menées dans des cohortes *a posteriori* ont tout de même permis de montrer que les personnes souffrant de MICI ayant subi du stress chronique pendant leur vie avaient un risque plus grand de présenter des formes actives de la maladie et des périodes de poussées plus longues. Des résultats similaires ont été observés chez les patients SII où le stress augmente la sévérité des symptômes [324]. Les études menées dans des cohortes constituées de militaires ayant subi des stress intenses et chroniques ont montré

qu'ils étaient plus susceptibles à l'anxiété et à la dépression, aux déficiences nutritionnelles, aux altérations hormonales, à l'immunosuppression et au développement d'infections que la population générale et qu'ils présentaient une dysbiose du microbiote intestinal [294] ***(Figure 61)***.

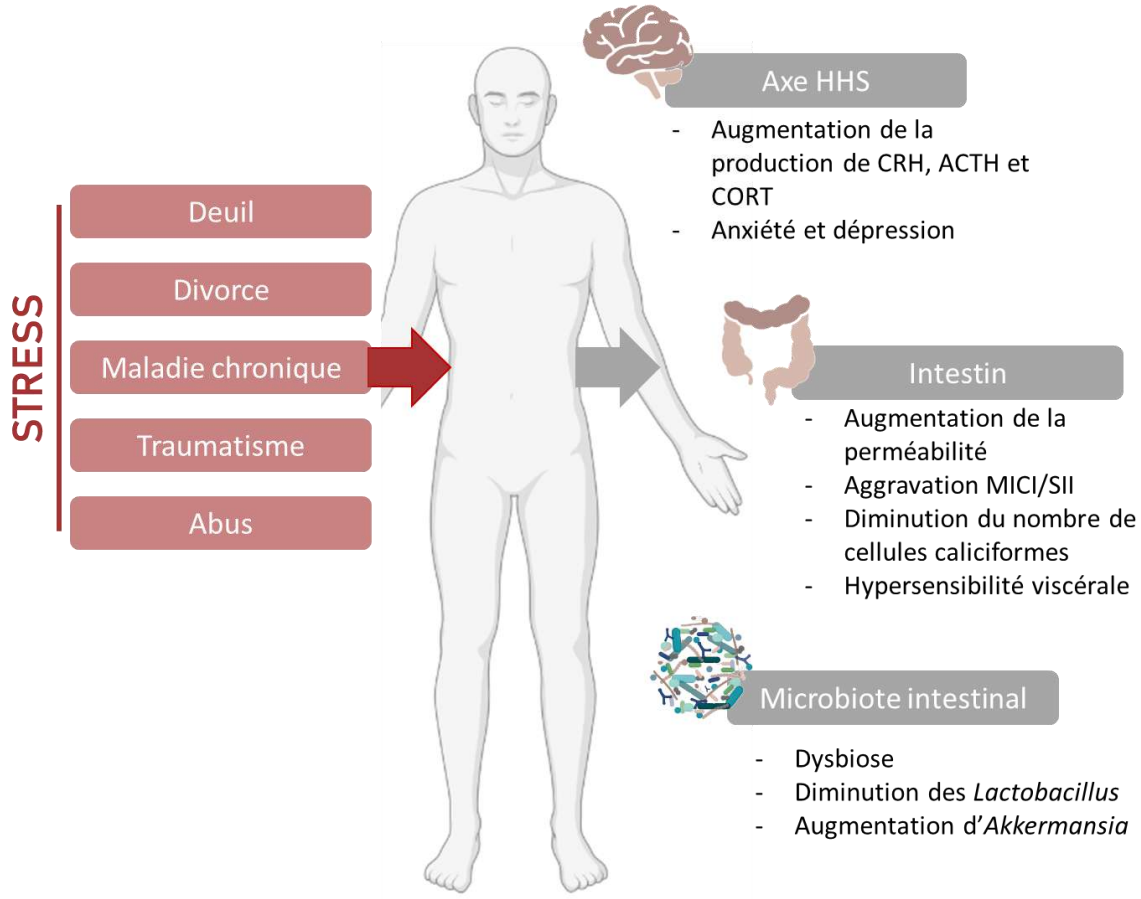


Figure 61 : Effet du stress chronique à l'âge adulte

B. Les 1000 premiers jours de vie

Beaucoup de grands systèmes (nerveux, immunitaires, intestinaux…) s'établissent au cours des 1000 premiers jours de vie de l'enfant en parallèle et de façon interdépendante avec l'établissement du microbiote intestinal. Le stress interagit avec tous ces systèmes et peut donc avoir des conséquences à long terme sur la santé de l'individu s'il impacte le bon déroulement de leur mise en place.

1. La période néonatale

Le modèle de stress néonatal le plus utilisé chez les rongeurs est le modèle de stress de séparation maternelle. Ce modèle mime la négligence parentale puisque la mère s'occupe moins bien de ses souriceaux. Les effets obtenus au niveau du comportement sont différents en fonction des protocoles utilisés. En effet, les périodes de séparations, courtes ou longues, et le type de séparation, individuelle ou par portée, varient suivant les études. Par exemple, une séparation maternelle (MS) longue induit de l'anxiété et de la dépression dans la descendance alors qu'une séparation maternelle inférieure à 15 min aurait plutôt les effets opposés [286], [313], [322]. Le protocole de MS long induit une hyperactivation de l'axe HHS, symbolisée par une augmentation de l'expression du CRH et des récepteurs aux GCs dans l'hypothalamus de la descendance. Ce stress induit également une augmentation du relargage de CRH, d'ACTH et de corticostérone et une inhibition du rétrocontrôle négatif [293], [325], [326]. L'adoption de souriceaux contrôles par des mères apportant peu de soin à sa progéniture entraîne les mêmes altérations. Inversement, des soins maternels actifs et nombreux ont un effet positif sur la maturation des souriceaux [325], [327], [328].

Chez les souris axéniques, le MS n'a aucun effet sur leur comportement anxieux ou dépressif. En revanche, lors d'un transfert fécal d'une souris MS à une souris contrôle, le microbiote ne s'implante pas de manière stable et tend vers la composition du microbiote d'une souris contrôle. Enfin, chez ces souris, le transfert de microbiote ne suffit pas à induire des effets sur leur comportement, montrant ainsi que le microbiote est nécessaire pour établir ce phénotype mais qu'il doit être accompagné de changements chez l'hôte [322].

Le modèle de séparation maternelle n'est pas seulement utilisé pour étudier les troubles comportementaux mais aussi pour étudier ses effets sur l'homéostasie intestinale. Le modèle MS reproduit dans la descendance des caractéristiques retrouvées chez certaines personnes atteintes de SII à savoir une augmentation de la perméabilité paracellulaire, de la sensibilité viscérale et une dysbiose du microbiote intestinal [286], [322], [329], [330], [309], [331]. Cette dysbiose du microbiote intestinal, comme lors du stress chronique subi à l'âge adulte, est caractérisée chez les mâles et les femelles par une diminution de l'abondance de *Lactobacillus* [286], [298], [332]. Cette diminution est retrouvée de façon constante au niveau de la muqueuse du côlon mais les résultats sont plus variables lorsque le microbiote est séquencé au niveau de la lumière [298]. La muqueuse intestinale est également impactée par la séparation maternelle

puisque chez ces animaux, les cryptes du côlon sont plus courtes, les cellules caliciformes sont moins nombreuses et ils sont plus sensibles aux colites induites par DSS ou TNBS [330], [333]–[335]. Chez le singe rhésus, une espèce plus proche de la nôtre, la séparation maternelle entraîne chez le jeune une augmentation du stress et une diminution de la population de *Lactobacillus* dans les fèces. Cette diminution était corrélée aux taux de stress de la descendance [298]. Ces résultats confirment l'impact du stress pendant cette période du développement, mais aussi la relation importante entre le stress et l'abondance de *Lactobacillus* **(*Figure 63)***.

Comme chez l'adulte en clinique, il est difficile de créer des cohortes suivant le stress pendant la période néonatale, la majorité des études sont menées *a posteriori*. Chez l'humain, la négligence physique et émotionnelle ainsi que les abus subis pendant l'enfance sont fortement associées à une augmentation de l'anxiété, de l'obésité et des troubles cardiovasculaires à l'âge adulte [326]. Chez l'adolescent, le facteur le plus souvent associé à des douleurs viscérales récurrentes était la détresse et la dépression maternelle à l'âge de 18 mois et de 12 ans. Cette étude établit le lien entre stress néonatal et douleur viscérale chez l'humain [336]. Enfin, les patients SII rapportent plus souvent avoir vécu des abus et des expériences négatives durant leur petite enfance que la population générale, ce qui étend ce lien de l'adolescence à l'âge adulte [324] **(*Figure 63)***.

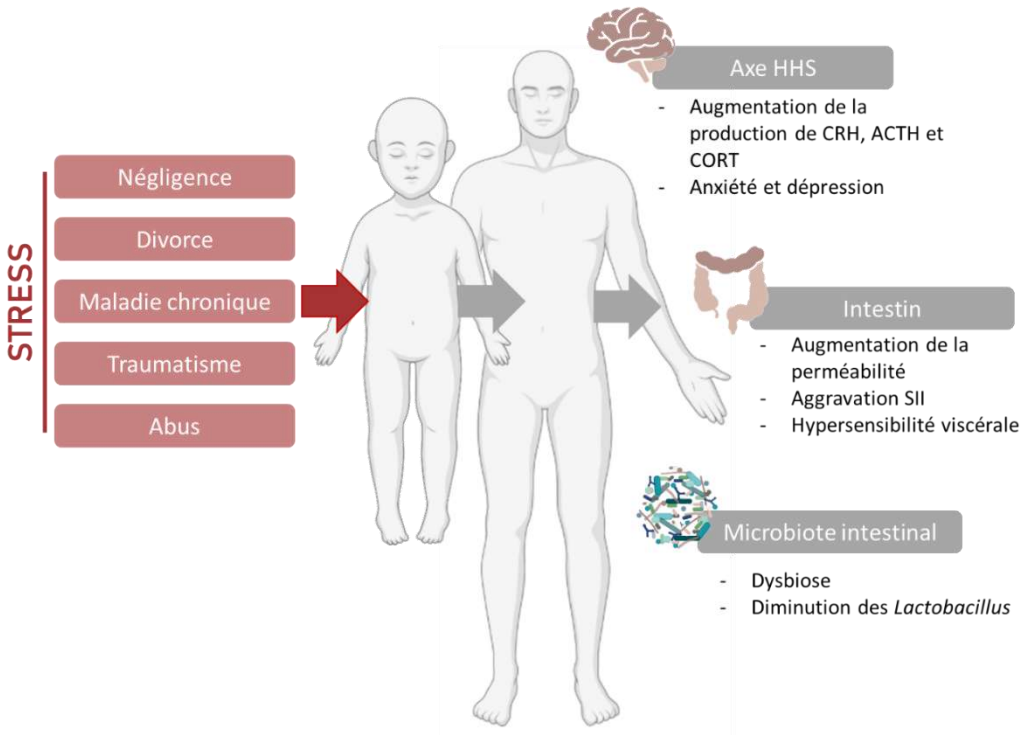


Figure 63 : Impact du stress chronique pendant la période néonatale

2. La période prénatale

La période prénatale représente un moment important dans le développement et la maturation des organes. Durant la gestation, l'embryon puis le fœtus sont susceptibles aux variations environnementales qui peuvent influer sur son développement. Ces impacts peuvent être différents en fonction de leur intensité, de leur durée et du moment de la gestation [337], [338].

Comme pour les modèles de stress adultes et néonataux, les modèles de stress prénataux (SP) ont été initialement développés pour étudier leurs impacts sur le comportement de la descendance [339], [326]. Chez les rongeurs, le stress prénatal est associé à une diminution du nombre de souriceaux par litière et de leur poids de naissance et une augmentation de leur mortalité. A l'âge adulte, il est associé à une augmentation de l'anxiété, de la dépression et d'une réponse de l'axe HHS plus intense et prolongée à un stress [306], [340], [341] [342].

En revanche, encore peu d'études se sont intéressées à l'impact du stress prénatal sur l'homéostasie intestinale. En 2015 et 2018, Golubeva *et al.* et Wang *et al.* [343], [344] ont montré que les rats SP présentaient une hypersensibilité viscérale mais pas de modification de la perméabilité paracellulaire. Ils présentaient également une dysbiose du microbiote intestinal caractérisée par une diminution de l'abondance en *Lactobacillus* retrouvée jusqu'au 4ème mois. Cette diminution de *Lactobacillus* est également retrouvée dans d'autres études menées chez la souris indépendamment de la période de stress au cours de la gestation [298], [345]. Chez le singe rhésus, l'exposition de la mère à un stress pendant le dernier trimestre de grossesse entraîne dans la descendance une diminution des *Lactobacillus* dans les fèces et de la diarrhée [294], [300]. Initialement développé pour étudier la dépression post-partum, l'utilisation de ce modèle permettrait de mieux comprendre le lien entre stress gestationnel et altération de l'homéostasie intestinale dans la descendance [309] ***(Figure 64)***.

Les études de l'impact du stress prénatal chez l'humain sont plus compliquées à mener, surtout à *posteriori*. Elles reposent fortement sur la mémoire maternelle et peuvent donc être biaisées. L'impact de ce stress est souvent étudié à la naissance ou dans les premiers mois de vie. Plus les effets étudiés sont éloignés de la naissance, plus les données relatives au stress sont basées sur des données auto-déclarées qui pâtissent des mêmes biais [339]. En prenant en compte ces facteurs, les études menées chez l'humain ont tout de même pu établir qu'il existe

un lien entre une incidence plus grande de maladies, comme l'eczéma, l'anxiété, l'asthme ou les troubles du comportement dans la descendance et l'exposition de la mère à un stress [342], [346], [347].

Le stress psychologique de la mère pendant la grossesse est commun. Environ 40% des femmes souffrent d'anxiété et/ou de dépression au cours de leur grossesse et ces taux sont sous-évalués puisque ces pathologies restent sous-diagnostiquées [309], [348]**.** De plus, différentes études ont montré que le stress lié à la grossesse est un facteur prédictif du taux de CRH plasmatique de la mère, du taux de cortisol plasmatique du nouveau-né et qu'il existe une corrélation positive entre le taux de cortisol capillaire de la mère et celui de son enfant à 6, 9 et 12 mois [305], [349]. Chez l'humain, peu d'associations ont été faites entre stress prénatal et homéostasie intestinale. Concernant l'impact du SP sur le microbiote, en 2020 et 2021, deux études ont montré que le microbiote des nourrissons était corrélé au microbiote maternel, au stress perçu par les mères pendant la grossesse et à leur taux de cortisol plasmatique ([295], [350]. En 2015, Zijlman *et al* [342] ont montré que de forts taux plasmatiques de cortisol maternel étaient associés à une augmentation des *Enterobacter* et des *Escherichia* ainsi qu'à une diminution de bactéries productrices d'acide lactique comme les *Lactobacillus* **(*Figure 64*)**. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans les études menées chez les rongeurs et chez le singe rhésus.

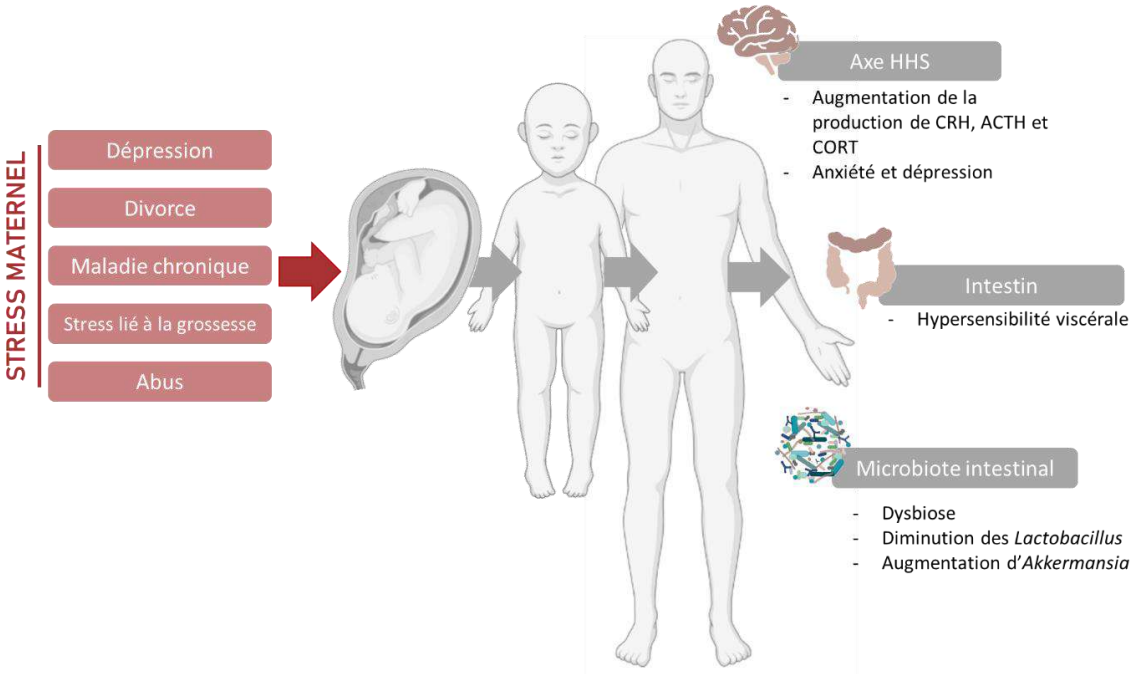


Figure 64 : Impact du stress chronique pendant la période prénatale

Les mécanismes impliqués dans la programmation de la physiologie de l'enfant par le stress prénatal sont encore méconnus. Bien que 80% de la corticostérone plasmatique soit inactivée par la HSD2, son expression diminue fortement pendant les derniers mois de la grossesse. Chez l'humain et chez les rongeurs, cette diminution est accentuée après un stress maternel [310], [346], [351]. Une plus grande quantité de corticostérone peut donc traverser la barrière hémato-encéphalique du fœtus. Chez les rongeurs, le stress prénatal diminue la densité de récepteurs aux GCs au niveau du NPV de l'hypothalamus impactant ainsi la capacité de réponse au stress de l'axe HHS. Chez l'humain, ces récepteurs sont exprimés dans l'hypothalamus dès la 24ème semaine de gestation et des variations de leur expression pourraient également être induites par le stress prénatal [338]**,** [311]. L'adrénalectomie de la mère inhibe les effets du stress prénatal chez le rat confirmant le rôle important de la corticostérone maternelle dans la programmation de la descendance [352] ***(Figure 65)***. Les GCs sont également retrouvés dans le lait maternel. Chez le singe rhésus, les taux de cortisol salivaires de la mère sont corrélés à ceux retrouvés dans son lait maternel. Cette augmentation de l'apport de GCs par le lait maternel pourrait avoir un impact sur le microbiote et l'homéostasie intestinale de l'enfant [352], [353] ***(Figure 65)***. Les glucocorticoïdes régulent également les marqueurs épigénétiques de nombreux gènes dont ceux de l'axe HHS. Ce mécanisme pourrait participer aux effets du stress prénatal sur l'altération de l'homéostasie intestinale. En 2017, Jašarević *et al.* [354] ont montré que chez la souris, le stress maternel précoce induit une altération du microbiote vaginal de la mère, corrélée à la dysbiose du microbiote intestinal observée dans la descendance. Bien que les mécanismes permettant au stress de moduler le microbiote vaginal n'ont pas été décrits, ces observations permettent d'émettre l'hypothèse que le stress gestationnel modifie le microbiote maternel et induit une implantation aberrante du microbiote chez l'enfant. L'implantation séquentielle du microbiote avant le sevrage est importante pour le développement de l'enfant (Chapitre 2). Son altération peut avoir des conséquences à long terme [295], [345] ***(Figure 65)***. En passant par le lait maternel, les GC pourraient aussi avoir un effet direct sur le microbiote de la descendance. Comme la corticostérone régule le métabolisme du cholestérol et donc des acides biliaires, des variations de sa concentration pourraient moduler les substrats utilisables par le microbiote. La

corticostérone régule également le système immunitaire et les cellules intestinales ayant un impact sur la composition du microbiote [295], [342] ***(Figure 65)***.

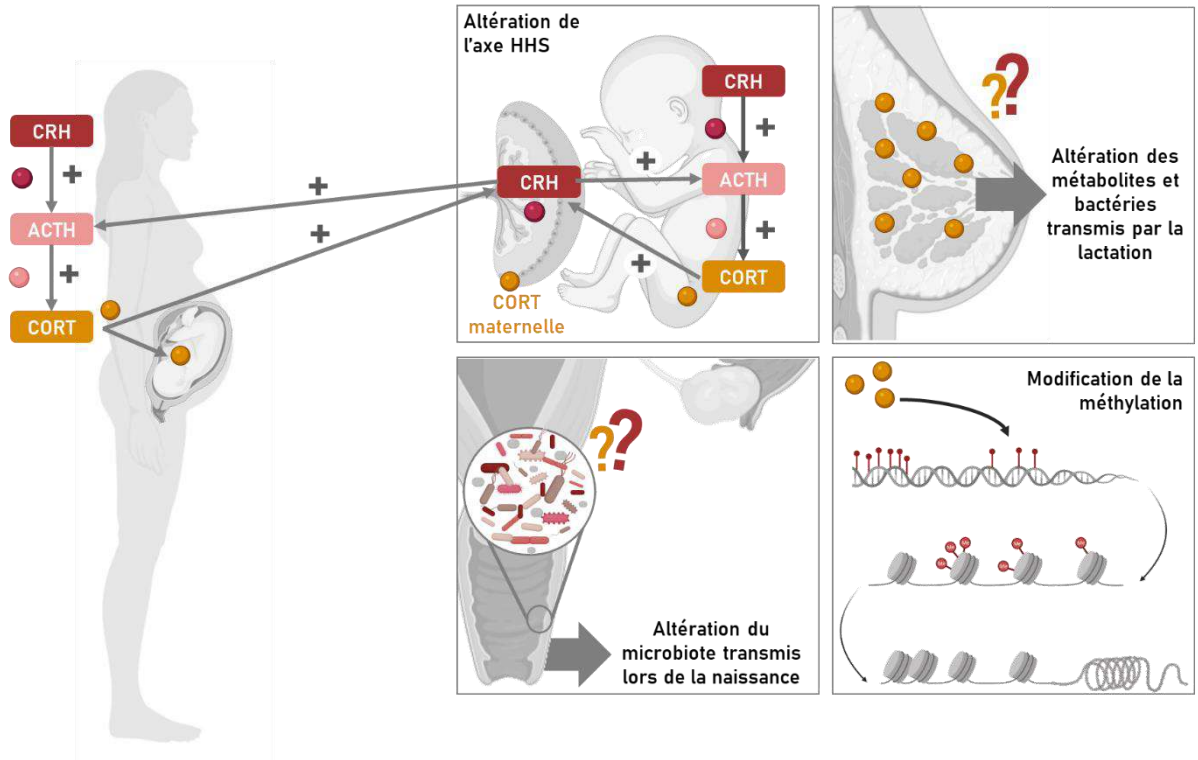


Figure 65 : Mécanismes potentiellement impliqués dans les effets du stress prénatal

3. Les différences mâles/femelles

Les stress prénataux et néonataux semblent entraîner des effets différents en fonction du sexe de la progéniture. Chez le rongeur soumis à un premier stress, le pic de corticostérone en réponse à un second stress est supérieur chez les femelles [311]. Pendant la période fœtale, la descendance femelle de mères stressées présente une expression supérieure de la CRH au niveau du NPV et un taux d'ACTH plasmatique supérieur aux mâles. Après un stress néonatal, des différences mâles/femelles, variables d'une étude à l'autre, sont également observées. Chez l'humain, les femmes rapportant des expériences négatives pendant l'enfance sont plus sujettes au développement de la dépression, de l'anxiété et du stress post-traumatique que les hommes. Elles possèdent aussi un taux de CRH plasmatique plus élevé en conditions basales, alors qu'après la survenue d'un nouveau stress, c'est celui des hommes qui subit l'augmentation la plus importante [311].

Ces études menées sur l'impact du stress pendant la période prénatale démontrent l'importance d'une communication materno-fœtale régulée. Le stress gestationnel impacte le développement des voies de réponse au stress, de l'intestin et du microbiote. Les mécanismes impliqués dans l'interaction entre ces acteurs doivent être mieux caractérisés et représentent un enjeu majeur pour la compréhension de l'impact du stress chronique sur l'homéostasie intestinale. Ce fut l'un des objectifs de mon travail de thèse.

Résultats

Objectifs des travaux de thèse

Par sa contribution à l'ensemble des grandes fonctions de l'organisme, le microbiote intestinal possède un rôle essentiel dans la physiologie et la pathologie de son hôte. Un microbiote est caractérisé par son répertoire de gènes exprimés et, plus important encore, par les métabolites qu'il sécrète. De nombreuses études ont déterminé la composition taxonomique du microbiote, mais peu en ont caractérisé les gènes actifs, les protéines ou les métabolites, ce qui pourrait être plus pertinent. En effet, la composition taxonomique du microbiote humain varie énormément d'un individu à l'autre (~55% de variations), alors que les voies métaboliques du microbiote sont en grande partie conservées (~80%) [186]–[188]. Même au sein de cohortes contenant des patients souffrant de la même maladie, il est difficile d'établir des profils taxonomiques clairs et reproductibles d'une étude à l'autre [355]. La redondance fonctionnelle du microbiote est capitale pour maintenir sa stabilité et sa résilience. A cette notion de redondance est associée l'idée que, jusqu'à un certain point, les espèces sont substituables d'un microbiote à l'autre en termes de fonctionnalité. Il est donc majeur d'identifier les métabolites du microbiote intestinal et de déterminer leur effet sur l'hôte. **C'est pourquoi notre objectif général était d'identifier et caractériser des métabolites lipidiques bactériens et leur impact sur l'homéostasie intestinale.** Pour cela, nous avons utilisé deux approches différentes, la première en ciblant un probiotique connu, et la seconde en induisant des modifications du microbiote commensal.

Pour le premier projet, nous avons étudié la production d'AGLC hydroxylés par *Escherichia coli* Nissle 1917, un probiotique utilisé dans le maintien des phases de rémission de la rectocolite hémorragique. Par spectrométrie de masse, nous avons identifié un AGLC β-hydroxylé, le C18-3OH, dont la production était supérieure chez EcN par rapport à des souches d'*E. coli* pathogènes ou commensales. Afin d'étudier les effets biologiques de ce lipide dans l'homéostasie intestinale, nous avons utilisé différents modèles *in vitro, ex vivo et in vivo* pour caractériser son mécanisme d'actions. Par une approche prébiotique, nous avons cherché à savoir si la sécrétion de cet AGLC β-hydroxylé était spécifique à EcN. Ces expériences nous ont permis d'établir que le C18-3OH peut être produit par d'autres bactéries commensales, apportant une nouvelle preuve de la redondance fonctionnelle du microbiote intestinal.

Pour la seconde approche, nous avons utilisé le stress comme variation environnementale pour moduler les fonctions du microbiote intestinal et en étudier l'impact sur la sensibilité viscérale qui en découle. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de stress prénatal, et avons étudié son impact sur l'homéostasie intestinale et le microbiote de la descendance adulte. A partir de ces données, nous avons identifié une espèce bactérienne, *Lactobacillus murinus*, dont l'abondance était diminuée dans les souris ayant subi un stress prénatal. Son abondance était inversement corrélée avec la sensibilité viscérale des souris. Par spectrométrie de masse, nous avons étudié les lipopeptides liés au GABA produits par cette espèce. Les lipopeptides identifiés ont également été quantifiés au niveau du côlon pour établir si le stress prénatal avait entraîné une altération globale du métabolisme des lipopeptides GABA par le microbiote intestinal. Enfin, nous avons étudié l'impact de ces métabolites dans l'homéostasie intestinale.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces différentes études ont fait l'objet de deux articles, un publié et un soumis, développés dans la partie résultats.

Résultats article 1 : Propriétés anti-inflammatoire d'un acide gras à longue chaîne bactérien dans la colite

Résumé :

Les données obtenues dans les essais cliniques suggèrent que certaines souches bactériennes probiotiques peuvent être utilisées dans les maladies chroniques de l'intestin, notamment pour augmenter le temps de rémission. Cependant, les données varient d'une étude à l'autre en fonction de la souche probiotique utilisée et leur mécanisme d'action reste peu connu. Par spectrométrie de masse, nous avons identifié et quantifié les acides gras à longue chaîne (AGLC) libres dans un probiotique et étudié ses effets dans un modèle murin de colite. Parmi les AGLC quantifiés chez *Escherichia coli Nissle 1917* (EcN), un probiotique recommandé dans le traitement de plusieurs maladies intestinales, la concentration de C18-3OH (acide 3-hydroxyoctadecaenoïque) était augmentée en comparaison des autres souches d'*E. coli* testées. L'administration orale de C18-3OH diminuait la colite induite par DSS chez la souris. Pour déterminer si d'autres bactéries du microbiote intestinal produisent du C18-3OH, nous avons modulé le microbiote intestinal en utilisant un prébiotique, les fructo-oligosaccharides (FOS). Les propriétés anti-inflammatoires du FOS étaient associées à une augmentation de la concentration de C18-3OH dans le côlon. Les analyses du microbiote caecal de ces souris ont montré que cette augmentation était corrélée avec une augmentation de l'abondance des genres *Holdemanella*, *Allobaculum* et *Parabacteroides*. En culture, *Holdemanella biformis*, la seule représentante de ce genre bactérien, produisait des quantités de C18-3OH supérieures à celles retrouvées dans EcN. Finalement, par TR-FRET (Time-resolved fluorescence energy transfer), nous avons démontré que le C18-3OH interagissait avec le domaine de liaison de PPARγ. La production de C18-3OH par les bactéries pourrait être l'un des mécanismes responsables des effets anti-inflammatoires des probiotiques. Plus généralement, la production d'AGLC β-hydroxylés par les bactéries pourrait être impliqué dans les interactions hôte – microbiote.

Résultats :

1. Quantification des acides gras β-hydroxylés produits par EcN

L'analyse par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier qu'EcN produisait différents AGLC dont des AGLC β-hydroxylés ayant une chaîne de carbone comprise entre 8 et 18 atomes de carbone, le plus abondant étant le C14-3OH, et des dérivés de l'acide linoléique comme les acides trihydroxyoctadecanoiques (10-TriHOME et 12-TriHOME), les acides dihydroxyoctadecanoiques (9,10-DiHOME et 12,13-DiHOME) et les acides hydroxyoctadecadienoiques (9-HODE et 13-HODE) ***(Figure 1A & 1B)***. Tous ces lipides ont pu être quantifiés à la fois dans les culots bactériens et dans le surnageant de culture de différentes souches du groupe phylogénétique B2 comprenant des pathogènes (NC101, NU14, UTI, CFT, et SP15), une commensale (M1/5), une asymptomatique (ABU) et une probiotique (ECN). Ces lipides sont donc produits et sécrétés par différentes souches d'*E. coli* ***(Figure 1C, Figure supplémentaire 2)***. Ces lipides étaient également produits par une souche d'*E. coli* du groupe phylogénétique A (MG1655) ne possédant par l'îlot génétique pks ***(Figure 1C)***. Les enzymes impliquées dans leur production sont donc différentes de celles permettant la synthèse des lipopeptides produits par *E. coli* et identifiés par notre équipe [207]. La classification hiérarchique de ces AGLC parmi les 9 souches a mis en évidence que les niveaux de production sont différents d'une souche à l'autre et qu'un AGLC β-hydroxylé, le C18-3OH, formait un cluster à lui tout seul ***(Figure 1C)***. La concentration de ce lipide était significativement augmentée chez EcN par rapport aux autres *E. coli* étudiées **(*Figure 1C & 1D*)**. Nous nous sommes donc focalisés sur ce lipide pour le reste de l'étude.

2. Le C18-3OH diminue la colite induite par le DSS

EcN ayant été identifiée comme diminuant la sévérité de l'inflammation dans les colites induites par le DSS [356], [357], nous avons émis l'hypothèse que cet effet pourrait être en partie médié via le C18-3OH. La quantification des scores inflammatoires macroscopiques et microscopiques, de la longueur et de l'épaisseur du côlon ont mis en évidence le rôle anti-inflammatoire de ce lipides **(*Figure 2B-E*)**. Cette diminution de l'intensité de la colite induite par le DSS était associée à une diminution de la perméabilité paracellulaire colique **(*Figure 2F*)**. Au niveau moléculaire, nous avons quantifié par spectrométrie de masse les métabolites des acides gras polyinsaturés dans l'inflammation et dans sa résolution. Le regroupement par

hiérarchisation a séparé ces métabolites en 3 clusters. Dans le premier, les concentrations de PGE_2, TxB_2, LtB_4, 8-isoPGA$_2$, 8-HETE et 6kPGF1α, connus pour leurs propriétés pro-inflammatoires, étaient augmentées chez les souris ayant reçu du DSS par rapport aux contrôles et diminuées chez les souris DSS traitées avec le C18-3OH. Dans le second cluster, les concentrations de PD_X et PGD_2 étaient augmentées dans le groupe DSS par rapport aux contrôles, et diminuées dans le groupe DSS/C18-3OH. Dans le dernier cluster, les concentrations du 5,6-EET, du 8,9-EET et du 14,15-EET étaient diminuées dans les souris ayant reçu du C18-3OH indépendamment du traitement par le DSS ***(Figure 2G)***. Au niveau de l'expression génique, le traitement par le C18-3OH normalisait l'expression de gènes augmentés lors de la colite : *RegIIIγ, Tjp1, Cxcl1 et Cxcl2,* respectivement, un peptide anti-microbien, une protéine des jonctions serrées et des chimiokines ***(Figure 2H)***. Ces résultats montrent que le traitement oral par le C18-3OH diminue l'inflammation du côlon causée par le DSS.

3. La diminution de la colite induite par le DSS par un prébiotique est associée avec une augmentation de C18-3OH et trois genres bactériens

Pour déterminer si les bactéries commensales du microbiote intestinal produisent des acides gras hydroxylés en position 3, les souris furent traitées avec un prébiotique aux effets anti-inflammatoires, le FOS (fructo-oligosaccharides) [358]–[360]. Ces carbohydrates, ne sont pas digestibles par les enzymes de l'hôte mais le sont par le microbiote au niveau du côlon favorisant ainsi la croissance des bactéries qui le métabolisent. L'effet anti-inflammatoire du FOS était comparable à ceux du traitement par le C18-3OH au niveau macro et microscopique, et au niveau moléculaire ***(Figure supplémentaires 6)***. La quantification des AGLC dans le côlon a mis en évidence une augmentation de la concentration de C18-3OH chez les souris DSS ayant reçu du FOS **(*Figure 3A)***. Les abondances des bactéries du microbiote caecal de ce groupe était caractérisé par une augmentation des genres *Akkermansia, Holdemanella, Allobaculum, Parabactéroides, Intestimonas, Blautia et Christensenella* **(*Figure 3B)***. L'abondance des genres *Holdemanella, Allobaculum et Parabactéroides* était corrélée avec la concentration colique de C18-3OH **(*Figure 3D)***. Le genre *Holdemanella* étant le plus abondant des 3 dans le groupe de souris traitées par le FOS et le DSS, nous avons émis l'hypothèse qu'une bactérie appartenant à ce genre pouvait produire et sécréter le C18-3OH. Nous nous sommes focalisés sur l'unique représentante de ce genre : *Holdemanella biformis,* anciennement appelée *Eubacterium biforme.*

In vitro, les quantités de C18-3OH dosées dans les culots bactériens ou dans le surnageant de cette bactérie étaient supérieure à celles retrouvées dans EcN **(*Figure 3E)***.

4. Le C18-3OH entre dans les cellules épithéliales intestinales où il se lie à PPARγ pour l'activer

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans les effets anti-inflammatoires du C18-3OH, nous avons d'abord déterminé s'il traversait la barrière épithéliale intestinale. Dans des expériences menées *in vitro, ex vivo et in vivo,* nous avons déterminé que le C18-3OH entrait dans les cellules épithéliales mais ne les traversait pas, limitant son effet à une activité locale sur les cellules épithéliales intestinales **(*Figure 4)***. Comme le C18-3OH entre dans les cellules épithéliales, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait interagir avec des récepteurs nucléaires. Parmi cette famille de récepteurs, des études ont mis en évidence l'activation de PPARγ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma) par des AGLC de 18 atomes de carbone hydroxylés en position 9 ou 13. Nous avons donc émis l'hypothèse que le C18-3OH pouvait interagir avec ce récepteur. Nous avons réalisé des expériences de binding compétitif par TR-FRET. Le C18-3OH, comme deux agonistes de synthèse de PPARγ, la rosiglitazone et le GW1929, se liait au récepteur ***(Figure 5A & 5B)***. Le traitement oral de souris contrôle par du C18-3OH induisait une augmentation de l'expression de gènes régulés par PPARγ : *Lfabp, Fiaf et Cxcl1.* Cet effet était inhibé par un prétraitement des souris par un antagoniste de PPARγ, le GW9962 ***(Figure 5C)***. Ces résultats suggèrent que la liaison du C18-3OH sur PPARγ pourrait être responsable de l'effet anti-inflammatoire de cet AGLC.

Conclusion :

L'addition d'EcN aux traitements standards de la rectocolite hémorragique (RCH) améliore le maintien des phases de rémission mais par leur induction [361]. L'utilisation de ce probiotique est maintenant recommandé dans les phases de rémission de la RCH depuis 2011 [362]. Dans cette étude, nous avons montré qu'EcN, une souche probiotique, a une capacité accrue de production de C18-3OH, un AGLC β-hydroxylé, par rapport à d'autres souches d'*E. coli*. Cette molécule a des effets de réduction de l'inflammation en prétraitement dans un modèle murin de

colite et pourrait être l'un des mécanismes associés aux effets anti-inflammatoires d'EcN. Une seconde approche utilisant un régime FOS, un prébiotique aux propriétés anti-inflammatoires, a permis de mettre en évidence qu'il était associé dans la colite à une augmentation de C18-3OH dans le côlon et à une modification de la composition du microbiote caecal des souris. Parmi les bactéries dont l'abondance était augmentée dans le groupe de souris traitées par le FOS et le DSS, *H. biformis* était corrélée à la concentration en C18-3OH et en produisait des quantités supérieures à celles produites par EcN en culture. Ces résultats suggèrent que *H. biformis* pourrait être un probiotique plus efficace qu'ECN pour diminuer l'inflammation *via* ce mécanisme. En revanche, les mécanismes impliqués dans la production et la sécrétion de cet AGLC restent à déterminer.

Comme le C18-3OH ne traverse pas la barrière épithéliale intestinale, nous avons émis l'hypothèse qu'il agît sur le récepteur nucléaire PPARγ, connu pour avoir des ligands lipidiques et des effets anti-inflammatoires. *In vitro*, par TR-FRET, nous avons montré que le C18-3OH pouvait interagir avec le domaine de liaison des agonistes de PPARγ. *In vivo,* le traitement de la colite par le C18-3OH ou le FOS a induit des effets similaires à ceux rapportés par des études utilisant des agonistes de PPARγ dans le traitement de la colite : une diminution de l'expression de *Cxcl1 et de RegIIIγ,* une diminution de la concentration d'EET, et une diminution de l'abondance des *Escherichia* [363]–[365]. Cependant, notre étude ne permet pas d'établir avec certitude que la fixation du C18-3OH à PPARγ est le seul mécanisme, ou le mécanisme principal impliqué dans ses effets *in vivo.*

L'administration de C18-3OH pourrait représenter un nouveau traitement pour les patients souffrant de MICI dans le maintien de leurs périodes de rémission. Des agonistes de PPARγ comme le 5-ASA sont déjà utilisés en clinique mais induisent des effets secondaires indésirables importants comme des bronchites ou des migraines [361], [366], [367]. L'utilisation de probiotiques ou du C18-3OH dont l'effet semble être essentiellement local pourrait apporter un effet bénéfique tout en limitant les effets systémiques indésirables. Bien que l'utilisation d'EcN soit recommandée dans le traitement de la RCH, *H. biformis,* endogène au microbiote humain [168], [169] n'a jamais été utilisée pour cette indication lors d'essais cliniques. En revanche, en 2020, dans un modèle préclinique de cancer colorectale, son utilisation comme probiotique exerçait des effets antitumoraux passant par PPARγ, ce qui ouvre la possibilité d'actions bénéfiques diverses pour cette bactérie et pour le C18-3OH [170]. Enfin, l'association d'un

probiotique, *Bifidobacterium longum,* et d'un prébiotique, le FOS, formant une association appelée symbiotique, a montré son efficacité dans l'amélioration de l'apparition d'inflammation chronique chez les patients RCH [368], [369]. Le même type d'approche utilisant le FOS et *H. biformis* pourrait avoir des effets similaires.

Cette étude a donc montré l'implication d'AGLC β-hydroxylés bactériens dans les interactions entre le microbiote et l'hôte. Les effets des AGLC β-hydroxylés pourraient ne pas être limités au C18-3OH et de nouvelles études permettront d'identifier les effets associés aux autres molécules de cette famille **(*Figure 66)***.

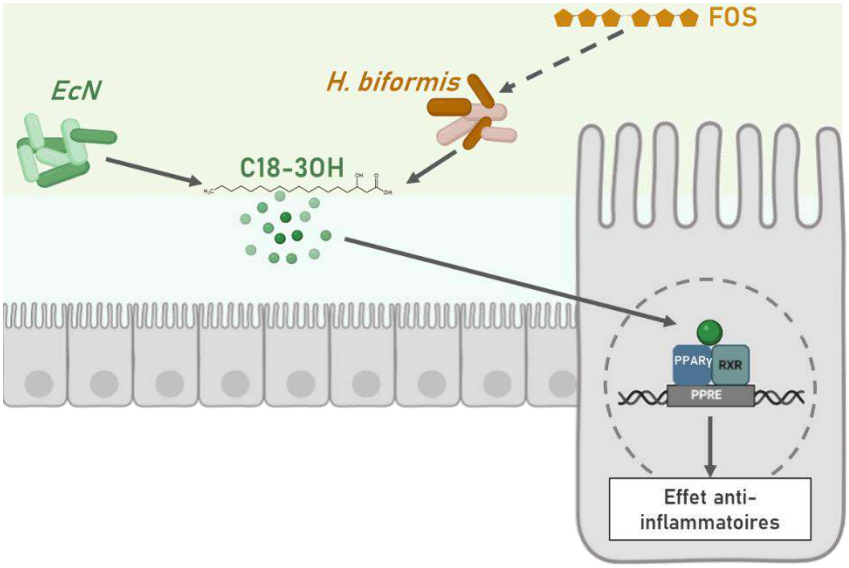


Figure 66 : Schéma bilan du premier papier

ORIGINAL RESEARCH

Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis

Julien Pujo,[1,2] Camille Petitfils,[1] Pauline Le Faouder,[3] Venessa Eeckhaut,[4] Gaelle Payros,[1] Sarah Maurel,[1] Teresa Perez-Berezo,[1] Matthias Van Hul,[5] Frederick Barreau,[1] Catherine Blanpied,[1] Stephane Chavanas,[6] Filip Van Immerseel,[4] Justine Bertrand-Michel,[3] Eric Oswald,[1,7] Claude Knauf ,[1,8] Gilles Dietrich,[1] Patrice D Cani ,[5,8] Nicolas Cenac [1]

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Nicolas Cenac, UMR1220, IRSD, INSERM, Toulouse, Occitanie, France; nicolas.cenac@inserm.fr

JP and CP are joint first authors.

Received 20 March 2020
Revised 15 July 2020
Accepted 30 August 2020

Check for updates

© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Pujo J, Petitfils C, Le Faouder P, *et al*. *Gut* Epub ahead of print: [*please include* Day Month Year]. doi:10.1136/gutjnl-2020-321173

ABSTRACT

Objective Data from clinical research suggest that certain probiotic bacterial strains have the potential to modulate colonic inflammation. Nonetheless, these data differ between studies due to the probiotic bacterial strains used and the poor knowledge of their mechanisms of action.

Design By mass-spectrometry, we identified and quantified free long chain fatty acids (LCFAs) in probiotics and assessed the effect of one of them in mouse colitis.

Results Among all the LCFAs quantified by mass spectrometry in *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), a probiotic used for the treatment of multiple intestinal disorders, the concentration of 3-hydroxyoctadecaenoic acid (C18-3OH) was increased in EcN compared with other *E. coli* strains tested. Oral administration of C18-3OH decreased colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. To determine whether other bacteria composing the microbiota are able to produce C18-3OH, we targeted the gut microbiota of mice with prebiotic fructooligosaccharides (FOS). The anti-inflammatory properties of FOS were associated with an increase in colonic C18-3OH concentration. Microbiota analyses revealed that the concentration of C18-3OH was correlated with an increase in the abundance in *Allobaculum*, *Holdemanella* and *Parabacteroides*. In culture, *Holdemanella biformis* produced high concentration of C18-3OH. Finally, using TR-FRET binding assay and gene expression analysis, we demonstrated that the C18-3OH is an agonist of peroxisome proliferator activated receptor gamma.

Conclusion The production of C18-3OH by bacteria could be one of the mechanisms implicated in the anti-inflammatory properties of probiotics. The production of LCFA-3OH by bacteria could be implicated in the microbiota/host interactions.

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Clinical use of probiotic bacteria is efficient for antibiotic-associated and *Clostridium difficile*-associated diarrhoea, and respiratory tract infections.
- Even if effective in animal models of colitis, probiotic bacterium therapies in human intestinal inflammatory diseases are inconclusive.
- There is a lack of knowledge on probiotic mechanisms of action.

What are the new findings?

- Two probiotic bacteria, *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Holdemanella biformis* produce high concentration of a free long chain fatty acid hyrdoxylated on the third carbon (LCFA-3OH): C18-3OH.
- Oral treatment with C18-3OH decreases dextran sulfate sodium-induced colitis in mouse.
- C18-3OH is an agonist of the peroxisome proliferator activated receptor gamma.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Bacterial LCFA-3OH could be implicated in microbiota/host interactions.
- *H. biformis* could have a therapeutic effect in inflammatory bowel diseases (IBD).
- Prebiotic fructooligosaccharides associated with the *H. biformis* and/or *E. coli* Nissle 1917 could be a novel therapeutic approach in IBD.

INTRODUCTION

A recent review of existing meta-analyses on clinical use of probiotics revealed that evidence-based effects of probiotics are only related to antibiotic-associated and *Clostridium difficile*-associated diarrhoea, and respiratory tract infections.[1] Regarding other fields, including intestinal inflammation, meta-analyses lack to define type and biological effects of probiotic strains. This discrepancy could be due to the probiotic bacterial strains used and the poor knowledge of their mechanisms of action. Comprehension of the mechanism of probiotic effects on the mammalian host is therefore of great necessity. Among probiotics, we focused on *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), a gram-negative strain (serotype O6: K5: H1) used as a probiotic in the treatment of diarrhoea, irritable bowel syndrome and inflammatory bowel diseases (IBDs).[2–4] However,

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

its probiotic effects are contrasted even in preclinical models. Oral administration of EcN decreases intestinal inflammation in chronic colitis induced by the transfer of $CD4^+CD62L^+$ T lymphocytes in severe combined immune-deficient mice.[5] In acute mouse models of colitis induced by the addition of dextran sulfate sodium (DSS) into the drinking water, the effect of EcN depends on the percentage of DSS used. In a 2% DSS model, EcN administration had no effect on the mucosal inflammation.[5] In contrast, for a dose of 3.5% DSS, EcN promotes recovery from DSS-induced intestinal injury associated with a decrease in pro-inflammatory molecules and an increase in mucins and tight junction proteins mRNA expression.[6] These few examples of the impact of EcN on colitis highlight the lack of current knowledge on the mechanisms underlying EcN probiotic activity. In vitro, few studies focused on the mechanism by which EcN decreases paracellular permeability and demonstrated that this bacterium increases tight junction proteins, Zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2, expression in epithelial cells and decreases the production of CXCL8.[7 8] In a previous study, we identified the EcN-derived lipopeptide C12AsnGABA*OH* as a mediator able to alleviate visceral hypersensitivity without affecting paracellular permeability.[9]

The aim of this study was to decipher the anti-inflammatory mechanism of EcN and to investigate whether it may be extended to other bacteria. Here, we show that a bacterial long chain fatty acid (LCFA) hydroxylated on the third carbon, C18-3OH, reduces colitis in mice by activating peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARγ) into epithelial cells.

METHODS

Animals

C57BL/6J mice aged 6–10 weeks (Janvier, Saint Quentin Fallavier, France) were used. Mice were raised in sanitary conditions without pathogens with free access to water and food and submitted to alternating cycles of 12 hours of light and darkness. Study design is developed in online supplemental material.

Identification of hydroxylated LCFA

The characterisation of hydroxylated LCFAs was performed on a high-performance liquid (U3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) coupled on line to a Fourier transform mass spectrometer (QExactive+high-resolution mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) following bacterial lipid extraction (online supplemental method).

RESULTS

Quantification of hydroxylated fatty acids produced by EcN

Based on the mass resolution of the mass spectrometer allowing the accurate m/z measurements and the analysis of product ion spectra, we identified several LCFA hydroxylated on the third carbon with Cn=C10, C12, C12:1, C14, C14:1, C16 or C16:1 (see online supplemental results and online supplemental figure 1). As the maximal length of fatty acid in *E. coli* is Cn=C18,[10] a quantitative method was developed on a low-resolution triple quadrupole mass spectrometer coupled online to a liquid chromatography to simultaneously quantify LCFA, from 8 to 18 carbons, hydroxylated on the third carbon (LCFA-3OH). In addition, linoleic acid metabolites and alpha-linolenic acid metabolites have been added to our quantitative method. All LCFA-3OH were quantifiable and C14-3OH was the most abundant (figure 1A). Low concentrations of linoleic acid metabolites: trihydroxyoctadecanoic acids (10-TriHOME and 12-TriHOME), dihydroxyoctadecanoic acids (9,10-DiHOME and 12,13-DiHOME) and hydroxyoctadecadienoic acids (9-HODE and 13-HODE), were quantified in EcN pellets (figure 1B). In contrast, 9-octadecadienoic and 13-octadecadienoic acids (9-oxoODE and 13-oxoODE) and alpha-linolenic acid metabolites, 9-hydroxyoctadecatrienoic and 13-hydroxyoctadecatrienoic acids were not detectable in bacterial pellets. The same lipids were quantified in the EcN culture medium (online supplemental figure 2).

LCFA metabolites were quantified in one strain of *E. coli* from phylogenetic group A (MG1655)[11] and eight strains from phylogenetic group B2 including five pathogens (NC101, NU14, UTI, CFT, SP15),[12–16] one asymptomatic (ABU),[17] one commensal (M1/5)[18] and one probiotic (EcN).[19] Hierarchical clustering of LCFA amounts quantified in bacterial pellets (pg/mg of proteins) was used to reveal the main differences between them (figure 1C). LCFA formed five different clusters. The first cluster was constituted by LCFA with a concentration increased in MG1655 and NC101 compared with the other strains (figure 1C). Of note, C14-3OH and 12,13-DiHOME were significantly increased in MG1655; C16-3OH and C16:1-3OH in MG1655 and NC101 and C18:1-3OH in NC101 compared with EcN (online supplemental figures 3 and 4). The second cluster discriminated LCFA which were highly produced in MG1655, SP15 and M1/5 (figure 1C). Only C12-3OH was significantly increased in SP15 compared with EcN (online supplemental figure 3). C18-3OH delineated the third cluster and was significantly increased only in EcN compared with other strains of *E. coli* (figure 1C,D). The fourth cluster was composed of LCFA expressed preferentially in CFT but with no significant difference in their concentration (figure 1C and online supplemental figures 3 and 4). The C10-3OH forming the fifth cluster was significantly increased in SP15 compared with EcN (figure 1C and online supplemental figure 3). Thus, among all LCFA quantified in *E. coli*, C18-3OH was the only one to be significantly upregulated in EcN compared with the other strains (figure 1D), warranting further investigation. Deletion or mutation of genes composing the pks island have no effect on C18-3OH synthesis (figure 1E).

C18-3OH decreases DSS-induced colitis

As EcN decreased inflammation in DSS-induced colitis model in rats[19] and mice,[6] we assessed the ability of C18-3OH to modulate DSS-induced colitis. Oral administration of C18-3OH in DSS mice did not change the body weight compared with DSS mice gavaged with the vehicle (figure 2A). Despite the absence of any effect on weight loss, C18-3OH significantly decreased macroscopic scores (figure 2B), colon thickness (figure 2C), microscopic scores (figure 2D) and increased colon length (figure 2E) in DSS mice. C18-3OH also decreased paracellular permeability in DSS-induced colitis in mice (figure 2F). Thus, oral administration of C18-3OH decreased the severity of the colitis induced by the DSS. Polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites were then quantified in the colonic tissue of the mice using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Resolvin E1 (RvE1), 11beta-prostaglandin $F_{2\alpha}$ (11β-$PGF_{2\alpha}$), RvD3, lipoxin B4 (LxB_4), RvD2, RvD1, leukotriene B_5 (LTB_5), maresin 1 (7MaR1), 5,6-dihydroxyeicosatetraenoic acid (5,6-DiHETE), 15dPGJ_2 and 11,12-epoxyeicosatrienoic acid (11,12-EET) were not quantifiable in our samples. Hierarchical clustering of PUFA metabolite amounts quantified in biopsies (pg/mg of protein) was used to reveal the main differences between untreated and DSS-treated mice administered with PBS or C18-3OH (figure 2G). PUFA metabolites formed three different clusters. The first cluster

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

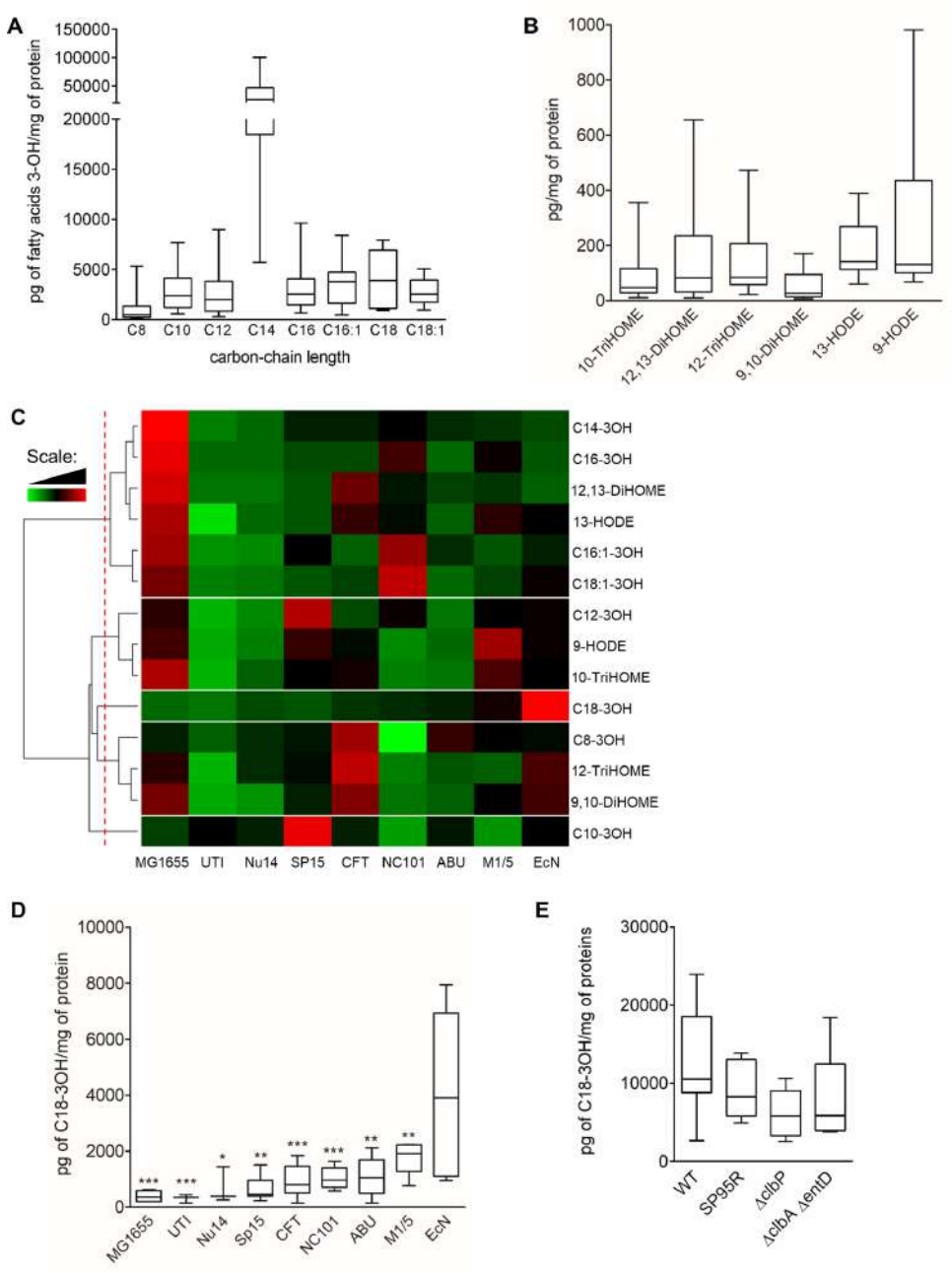


Figure 1 Quantification of hydroxylated long chain fatty acids by LC-QQQ in bacterial pellets. Quantification of long chain fatty acid (LCFA) hydroxylated on the third carbon (A) and of metabolites from linoleic acid (C18:2n-6) (B) in *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Data are represented as whiskers plot (min to max, centred value at median). N=5–10 experiments of three independent bacterial cultures per group. (C) Heat map of hydroxylated LCFA quantified by LC-QQQ. Data are shown in a matrix format: each row represents a single lipid, and each column represents a strain of *E. coli*. Each colour patch represents the normalised quantity of LCFA (row) in a strain of *E. coli* (column), with a continuum of quantity from bright green (lowest) to bright red (highest). The pattern and length of the branches in the dendrograms reflect the relatedness of the polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites. The dashed red line is the dendrogram distance used to cluster PUFA metabolites. (D) Quantification of C18-3OH in the different strain of bacteria. Data are represented as whiskers plot (min to max, centred value at median). N=5–10 experiments of three independent bacterial cultures per group. (E) Quantification of C18-3OH in EcN clbP-S95R (S95R), EcN ΔclbP (ΔclbP), EcN ΔclbA ΔentD (ΔClbA ΔentD) and wild type (WT) bacteria. Data are represented as whiskers plot (min to max, centred value at median). N=2 experiments of five independent bacterial cultures per group. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from EcN.

contained products derived from n-6 PUFA known for their pro-inflammatory properties (PGE_2, thromboxane B_2 (TXB_2), LtB_4, $PGF_{2\alpha}$ and $6kPGF_{1\alpha}$). The concentrations of these metabolites composing the first cluster was higher in DSS mice administered with vehicle (figure 2G). PGE_2, 6kPGF1a, TxB_2, 8-HETE, LtB4 and 8-isoPGA2 that were significantly increased in DSS mice were decreased by the treatment with C18-3OH (online supplemental figure 5). No statistical differences between groups were observed for all the other metabolites composing this cluster. The second cluster, composed mainly by n-3 PUFA metabolites,

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

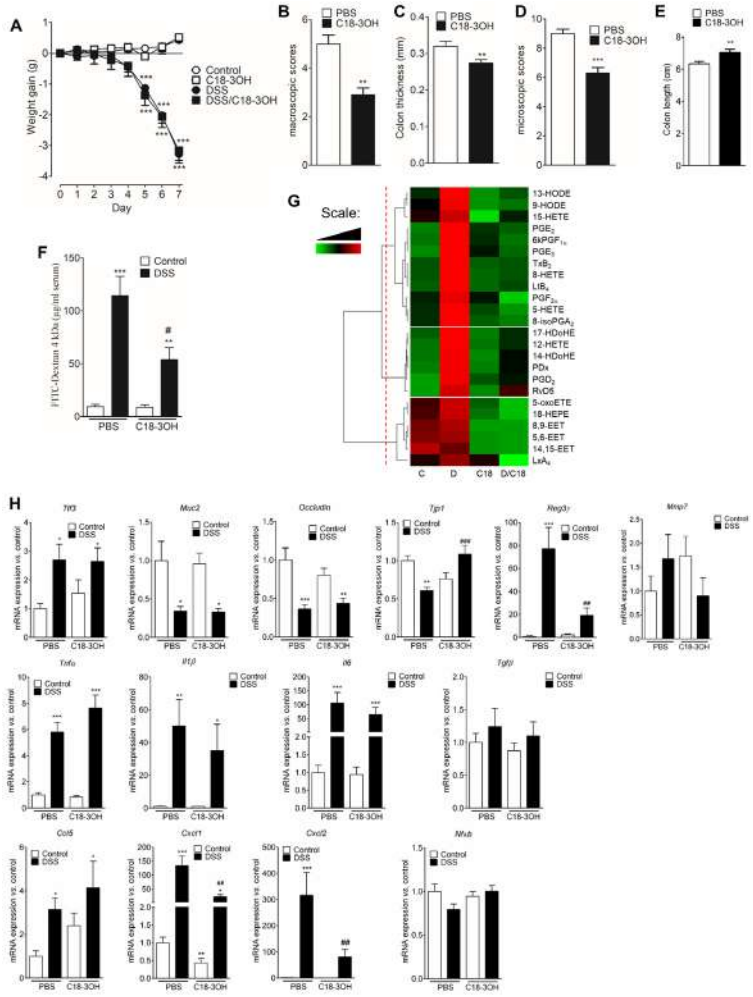


Figure 2 Oral administration of C18-3OH reduces dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. acute colitis was induced by adding 3% DSS into the drinking water for 7 days. Mice were gavaged every day for 9 days (2 days before and the 7 days during DSS treatment) with 100 µM of C18-3OH solubilised in 100 µL of PBS/ethanol 3% or with the vehicle (PBS/ethanol 3%). (A) Weight gain was observed in DSS-treated (black symbols) or control mice (white symbols) treated with C18-3OH (square) or its vehicle (PBS, circle). Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed using repeated-measures two-way ANOVA and a Bonferroni's multiple comparisons post hoc tests. ***p<0.001 significantly different from control group. Colitis severity was assessed by macroscopic damage scores (B), colon thickness (C), microscopic damage scores (D) and colon length (E) in 3% DSS mice gavaged with C18-3OH (black bars) or vehicle (PBS, white bars). Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. **p<0.01, ***p<0.001 significantly different from PBS group. (F) In order to determine intestinal paracellular permeability, 4 hours after oral administration of FITC dextran 4 kDa, FITC fluorescence was quantified in the serum of mice treated with the DSS (black bars) or their control (white bars) and treated with C18-3OH (right bars) or its vehicle (PBS, left bars). Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from control/PBS group and # p<0.05, significantly different from DSS/PBS group. (G) Heat map of polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites quantified by LC-MS/MS. Data are shown in a matrix format: each row represents a single PUFA metabolite, and each column represents a group of mice: C, control; D, DSS; C18, C18-3OH and D/C18, C18-3OH/DSS. each colour patch represents the normalised quantity of PUFA metabolites (row) in a group of mice (column), with a continuum of quantity from bright green (lowest) to bright red (highest). The pattern and length of the branches in the dendrogram reflect the relatedness of the PUFA metabolites. The dashed red line is the dendrogram distance used to cluster PUFA metabolites. (H) mRNA of several genes were quantified in colon of mice treated with the DSS (black bars) or their control (white bars) and treated with C18-3OH (right bars) or its vehicle (PBS, left bars) by quantitative real-time PCR. mRNA content was normalised to HPRT mRNA and quantified relative to the control/PBS group. Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from control/PBS group and ## p<0.01, ### p<0.001 significantly different from DSS/PBS group.

discriminated concentration of metabolites increased in both DSS and C18-3OH/DSS mice (figure 2G). The six metabolites composing this cluster were significantly increased in DSS mice compared with control mice (online supplemental figure 5). Among these, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE), protectin Dx (PDx) and PGD_2 were significantly decreased by treating mice with C18-3OH (online supplemental figure 5). The concentrations of EET (5,6-EET, 8,9-EET and 14,15-EET), LxA_4, 5-oxo-eicosatetraenoic acid (5-oxoETE) and 18-hydroxyeicosapentaenoic acid (18-HEPE), delineating the third cluster, were decreased following C18-3OH treatment in both control and DSS mice (figure 2G). EET concentrations were significantly decreased in C18-3OH and C18-3OH/DSS mice compared with control and DSS mice (online supplemental figure 5). Thus, the quantification of PUFA metabolites were in line with the anti-inflammatory properties of C18-3OH.

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

Further, we observed that DSS mice showed increased expression of the genes encoding the trefoil factor 3 (*Tff3*) a stabiliser of the mucus layer and the antimicrobial peptide regenerating islet-derived protein 3 gamma (*Reg3γ*) (figure 2H). In contrast, expression of the genes encoding for the mucin 2 (*Muc2*) and the tight-junction proteins occludin and zonula occludens 1 (*Tjp1*) were decreased (figure 2H). Expression of the genes *Reg3γ* and *Tjp1* was normalised by C18-3OH treatment (figure 2H). DSS-induced colitis was also associated with an increase in mRNA levels of both cytokines (*Tnfα*, *Tgfβ*, *Il1β* and *Il6*) and chemokines (*Ccl5*, *Cxcl1* and *Cxcl2*). As shown in figure 2H, the administration of C18-3OH in DSS colitis mice resulted in a significant inhibition of the chemokines *Cxcl1* and *Cxcl2*. Expression of *Nfκb* was unchanged (figure 2H). Taken together, our results showed that C18-3OH exhibits an anti-inflammatory activity in colitis mice.

Inhibition of DSS-induced colitis by using prebiotics is associated with an increase in C18-3OH and three correlating bacterial genera

In order to determine if other intestinal bacteria are able to produce LCFA-3OH, mice were treated with prebiotics (ie, fructooligosaccharides (FOS) which are non-digestible carbohydrates hydrolysed only by intestinal microbiota mainly in the ascending colon.[20] As previously observed for C18-3OH, FOS has no effect on weight loss (online supplemental figure 6A) but decreased both inflammatory parameters (online supplemental figure 6B–E) and paracellular permeability in colitis mice (online supplemental figure 6F). Quantification of LCFA-3OH revealed a significant increase in C18-3OH in FOS/DSS group compared with control or DSS group (figure 3A). Among all other lipid tested, only C16-3OH showed an increased concentration in DSS/FOS groups as compared with control (online supplemental figure 7A) but its concentration was similarly increased in DSS group compared with control. Hence, C16-3OH could unlikely account for the anti-inflammatory effect of FOS diet. Thus, the anti-inflammatory effects of FOS were associated only with the increase in C18-3OH DSS mice. Hierarchical clustering of the PUFA metabolites revealed four clusters (figure 3B). Interestingly, the composition of the different clusters was comparable to the clusters obtain in the C18-3OH experiments, except one new cluster (cluster 2, figure 3B). This cluster was composed by RvD5 and PDx, two pro-resolving bioactive lipids,[21] significantly increased in the DSS/FOS group compared with control (online supplemental figure 5) suggesting that they could participate to the anti-inflammatory properties of the prebiotic treatment. Treatment with FOS of DSS-induced colitis mice decreased the concentration in pro-inflammatory prostaglandins (PGE_2, PGD_2 and $PGF_{2\alpha}$), LtB_4 and TxB_2 (online supplemental figure 7) as observed with the treatment with the C18-3OH (online supplemental figure 5). In agreement with a role of C18-3OH in the effects of FOS, the concentrations of EET were decreased in DSS/FOS group compared with control and DSS group (online supplemental figure 7D) as shown for C18-3OH (online supplemental figures 5C and 7D). Regulation of gene expression in mice treated with FOS also uncovered similarities with the C18-3OH/DSS mice. Indeed, FOS decreased *Reg3g*, *Tjp1*, *Cxcl1* and *Il1β* gene expression in DSS-induced colitis (online supplemental figure 8). In order to identify bacteria potentially implicated in the increased concentration of C18-3OH, we performed a microbiota analysis. Hierarchical clustering of the % of the genus revealed six clusters (figure 3C). The first cluster was constituted by genus with an abundance increased in FOS/DSS mice (figure 3C). Abundances in *Akkermansia*, *Holdemanella*, *Allobaculum*, *Parabacteroides*, *Intestinimonas*, *Blautia* and *Christensenella* were significantly increased in FOS/DSS group compared with control (online supplemental figure 9A). Abundances in *Akkermansia*, *Holdemanella*, *Allobaculum* and *Parabacteroides* were also significantly increased in FOS/DSS group compared with DSS group (online supplemental figure 9A). The second cluster discriminated abundances in genera decreased in DSS group. In contrast, abundance in genera of bacteria composing the third cluster was increased in DSS group (figure 3C). Abundances in *Odoribacter*, *Escherichia*, *Turicibacter* and *Coprococcus* were significantly increased in DSS group compared with control group (online supplemental figure 9B) and abundances in *Turicibacter* and *Coprococcus* were significantly decreased in the FOS/DSS group compared with DSS group (online supplemental figure 9B). The fourth cluster was composed by abundances in genera decreased in FOS/DSS, the fifth by abundances increased in control and the sixth by abundances increased in FOS group (figure 3C). Significant differences were observed for the abundance in *Barnesiella*, *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Butyrivibrio*, *Nubsella* and *Pedobacter* between DSS group and control for the cluster 5 and, in *Kopriimonas* and *Bifidobacterium* between FOS group and control for the cluster 6 (online supplemental figure 9C,D). Only the abundances in *Akkermansia*, *Holdemanella*, *Allobaculum* and *Parabacteroides* were increased in the FOS/DSS group compared with control and DSS mice (figure 3C and online supplemental figure 9A) as observed for the concentration of C18-3OH (figure 3A). In order to determine which genus of bacteria could be implicated in the production of C18-3OH, we studied the correlation between the abundance in these four genera and the concentration of C18-3OH. The concentration of C18-3OH was correlated with the abundance in *Holdemanella*, *Allobaculum* and *Parabacteroides* but not *Akkermansia* (figure 3D). We cultured *Holdemanella biformis* to quantify LCFA-3OH in bacterial pellets and supernatants. All LCFA-3OH, except C16:1-3OH, were quantifiable in *H. biformis* and in its supernatant (online supplemental figure 10). The concentration of C18-3OH in *H. biformis* was higher than in EcN (figure 3E). Thus, a bacterium of the genus *Holdemanella* might be implicated in the increased of C18-3OH concentration observed in FOS/DSS mice.

C18-3OH enters into epithelial cells where it binds to and activates PPARγ

In order to study the mechanism by which C18-3OH decreased colitis, we investigated whether this molecule was able to cross the intestinal epithelial barrier (IEB). In a first set of experiments, confluent human intestinal epithelial cells (caco2) differentiated in Transwell chambers were treated at the apical side by C18-3OH at different concentrations (0 µM, 1 µM, 10 µM and 100 µM) (online supplemental method). C18-3OH concentration was significantly increased in cells 24 hours after treatment with 10 µM or 100 µM of C18-3OH (figure 4A). Further kinetics experiments showed that the accumulation of C18-3OH was optimal within 6 hours (figure 4B). For all the experimental conditions tested, C18-3OH was never recovered in the basolateral compartment (figure 4A,B). In agreement, treatment with C18-3OH did not modify the paracellular permeability of the caco2 cell monolayer (online supplemental figure 11). These findings suggest that C18-3OH enters intestinal cells but does not seem to be able to cross the intestinal barrier. In a second set of experiments, we evaluated the passage of C18-3OH through

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

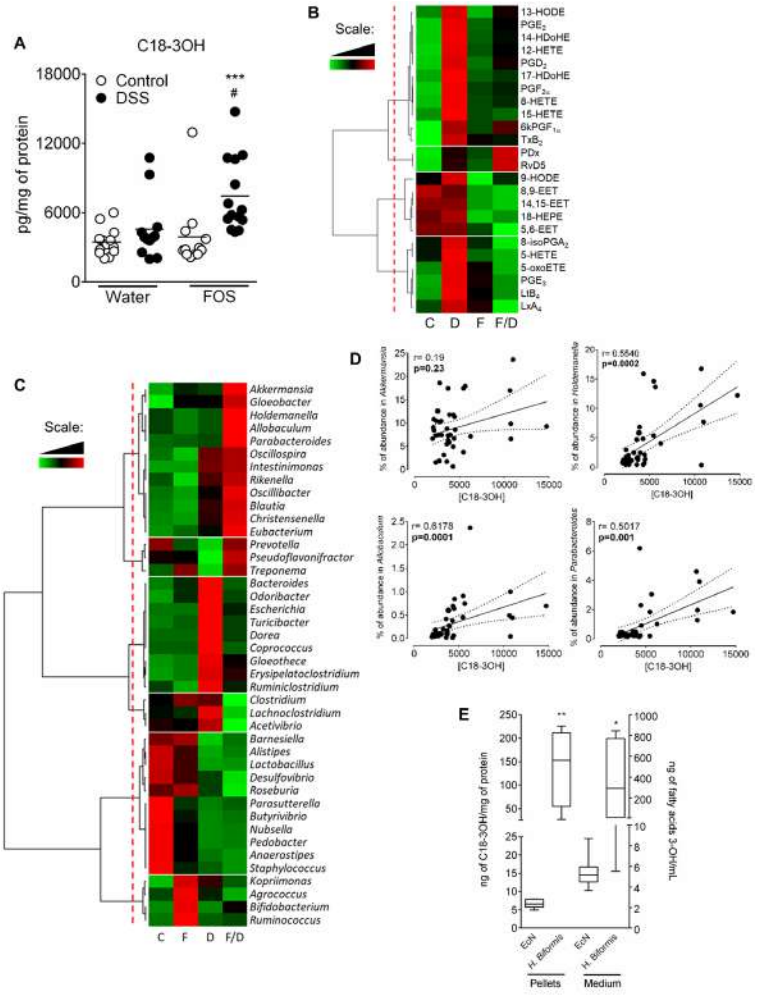


Figure 3 Fructooligosaccharides (FOS) diet increases C18-3OH concentration in colitis and gut microbiota analysis. Acute colitis was induced by adding 3% dextran sulfate sodium (DSS) into the drinking water for 7 days. FOS (10%) was added to the drinking water for 10 days (3 days before and the 7 days during DSS treatment). (A) Quantification of C18-3OH in colon of mice treated with the DSS (black symbols) or their control (white symbols) and treated with FOS (right) or not (left). Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *p<0.05, ***p<0.001, significantly different from control/water group and #p<0.05, significantly different from DSS/water group. (B) Heat map of polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites quantified by LC-MS/MS. Data are shown in a matrix format: each row represents a single PUFA metabolite, and each column represents a group of mice: C, control; D, DSS, F, FOS and F/D, FOS/DSS. Each colour patch represents the normalised quantity of PUFA metabolites (row) in a group of mice (column), with a continuum of quantity from bright green (lowest) to bright red (highest). The pattern and length of the branches in the dendrogram reflect the relatedness of the PUFA metabolites. The dashed red line is the dendrogram distance used to cluster PUFA metabolites. (C) Heat map of % of abundance in genus determinate by Illumina sequencing method. Data are shown in a matrix format: each row represents a single genus, and each column represents a group of mice: C, control; D, DSS, F, Fos and F/D, FOS/DSS. Each colour patch represents the normalised quantity of PUFA metabolites (row) in a group of mice (column), with a continuum of quantity from bright green (lowest) to bright red (highest). The pattern and length of the branches in the dendrogram reflect the relatedness of the PUFA metabolites. The dashed red line is the dendrogram distance used to cluster PUFA metabolites. (D) Correlation between the concentration of C18-3OH in the colonic tissue and % of abundance in *Akkermansia*, *Holdemanella*, *Allobaculum* and *Parabacteroides*. C18-3OH and % of abundance were determined for each mouse (black circle). Coefficient of correlation (r) between the % of abundance and the concentration of C18-3OH in the colonic tissue of mice was calculated. Data are represented as aligned dot plot with mean and errors linear regression lines. The significance of each correlation is indicated on each graphic by the p value. (E) Quantification of long chain fatty acid hydroxylated on the third carbon in bacterial pellets and culture medium of *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) and *Holdemanella biformis*. Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01, significantly different from EcN group.

the intestinal epithelium using Ussing chambers where a luminal compartment and a serosal compartment are delineated by biopsies from the colon, the ileum or Peyer patches ex vivo (online supplemental method). One hour after addition of C18-3OH (1 µM and 100 µM) in the luminal compartment, its concentration was increased in the colonic tissue (figure 4C), ileum or Peyer patches tissues (online supplemental figure 11B,C) but remained at low levels in the serosal compartment (figure 4C, online supplemental figure 11B,C). The paracellular permeability was not modified by C18-3OH (1 µM and 100 µM) treatment in either of the tissue samples (online supplemental figure 11D). Finally, the passage of C18-3OH was assessed in vivo (online supplemental method). Mice were orally administered with 100 µM C18-3OH daily for 7 days. Blood, colon, ileum and Peyer patches were then collected to quantify C18-3OH by LC-MS/MS 30 min, 2 hours and 4 hours after the last gavage. C18-3OH

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

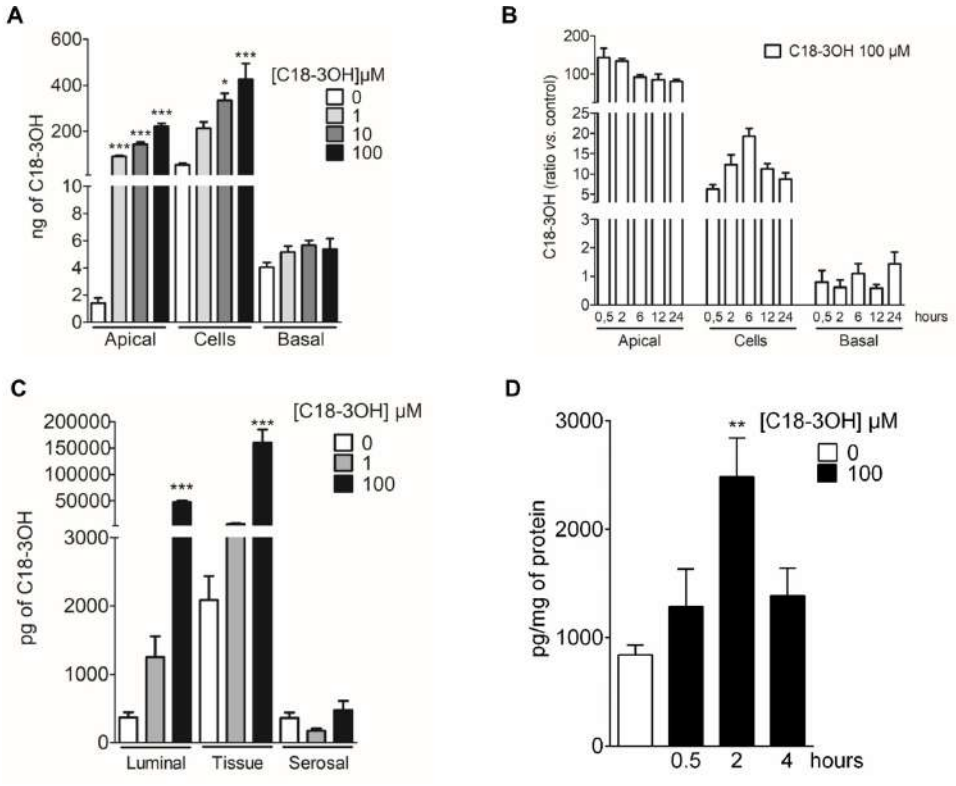


Figure 4 C18-3OH does not cross the epithelial barrier and penetrates the epithelial cells. Caco2 cells were cultivated into Transwell chambers. After 24 hours treatment with C18-3OH (0 µM white bar, 1 µM light grey bar, 10 µM dark grey bar or 100 µM black bar) at the apical side (A) or 0.5, 2, 6, 12 and 24 hours after C18-3OH treatment (100 µM, (B), C18-3OH was quantified inside the cells and at both the apical and basolateral compartments by LC-MS/MS. n=5 experiments of three wells per condition. (C) One hour after treatment with C18-3OH (0 µM white bar, 1 µM grey bar or 100 µM black bar) at the luminal side of a colonic biopsy mounted in Ussing chamber, C18-3OH was quantified in the luminal and serosal compartment and in the tissue. n=12–15 experiments. (D) Mice were orally treated with C18-3OH (0 µM white bar or 100 µM black bar) every day during 7 days and C18-3OH was quantified 30 min, 2 hours and 4 hours after the last gavage in the colonic tissue. Data are represented as mean±SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from 0 µM of C18-3OH condition.

concentration was only increased in the colonic tissue 2 hours after the last gavage (figure 4D). No change in C18-3OH concentration was observed in all the other organs whatever the time point (figure 4D, online supplemental figure 12). Thus, as assessed in vitro, ex vivo and in vivo, C18-3OH does not cross the IEB.

As C18-3OH enters epithelial cells, we hypothesised that it could interact with intracellular receptor such as the PPARγ. To study the ability of C18-3OH to bind PPARγ, we performed a competitive TR-FRET ligand-binding assay. C18-3OH directly bound to purified human PPARγ LBD with an IC50 of 1.11 µM, which was weaker than that of rosiglitazone used as a positive control (IC50=0.22 µM) (figure 5A). C18-3OH (10 µM) significantly decreased the TR-FRET ratio, along with the two known PPARγ agonists Rosiglitazone (10 µM) and GW1929 (1 µM) (figure 5B). In contrast, C14-3OH (10 µM) and C16-3OH (10 µM) were not able to bind to PPARγ (figure 5B). These findings showed that C18-3OH is able to specifically bind PPARγ. Then, we investigated whether the binding of PPARγ by C18-3OH regulated the expression of known PPARγ target genes. Mouse gavage by C18-3OH increased expression of the *Lfabp* and *Fiaf* genes, decreased that of *Cxcl1* and showed no effect on *Cd36* (figure 5C). Furthermore, treatment of mice by a specific PPARγ antagonist, GW9662, abrogated C18-3OH effects on gene expression (figure 5C). In conclusion, our findings indicate that C18-3OH is an activating ligand of PPARγ, and strongly suggest that activated PPARγ has a key role in the anti-inflammatory effect of C18-3OH.

DISCUSSION

The administration of EcN in conjunction with standard therapy to ulcerative colitis (UC) patients did not increase the remission induction rate while the treatment with this probiotic could have a similar effect to mesalazine in maintaining remission.[22] Since 2011, the use of EcN is recommended for the maintenance of remission in human UC.[23] Anti-inflammatory mechanisms of EcN are mainly associated with its ability to interfere with different cell pathways like NF-κB or to modulate the activity of the MAPKs.[24 25] In this study, we showed that the production of C18-3OH by *E. coli* is enhanced in EcN compared with pathogenic, asymptomatic and commensal *E. coli*, making it a potential component of the anti-inflammatory effect. In order to study the potential anti-inflammatory effect of C18-3OH, we assessed the effect of C18-3OH pretreatment in DSS-induced colitis and established that this lipid decreased colitis. In order to assess if the pks island harboured by EcN could be implicated in the production of C18-3OH, we quantified it in EcN deleted for the peptidase encoded by *clbP* (EcN ΔclbP) or with a mutation on the catalytic site of the peptidase (EcN clbP-S95R) and in EcN unable to produce enterobactin, salmochelin, yersiniabactin and colibactin (EcN ΔclbA ΔentD). These different mutations known

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

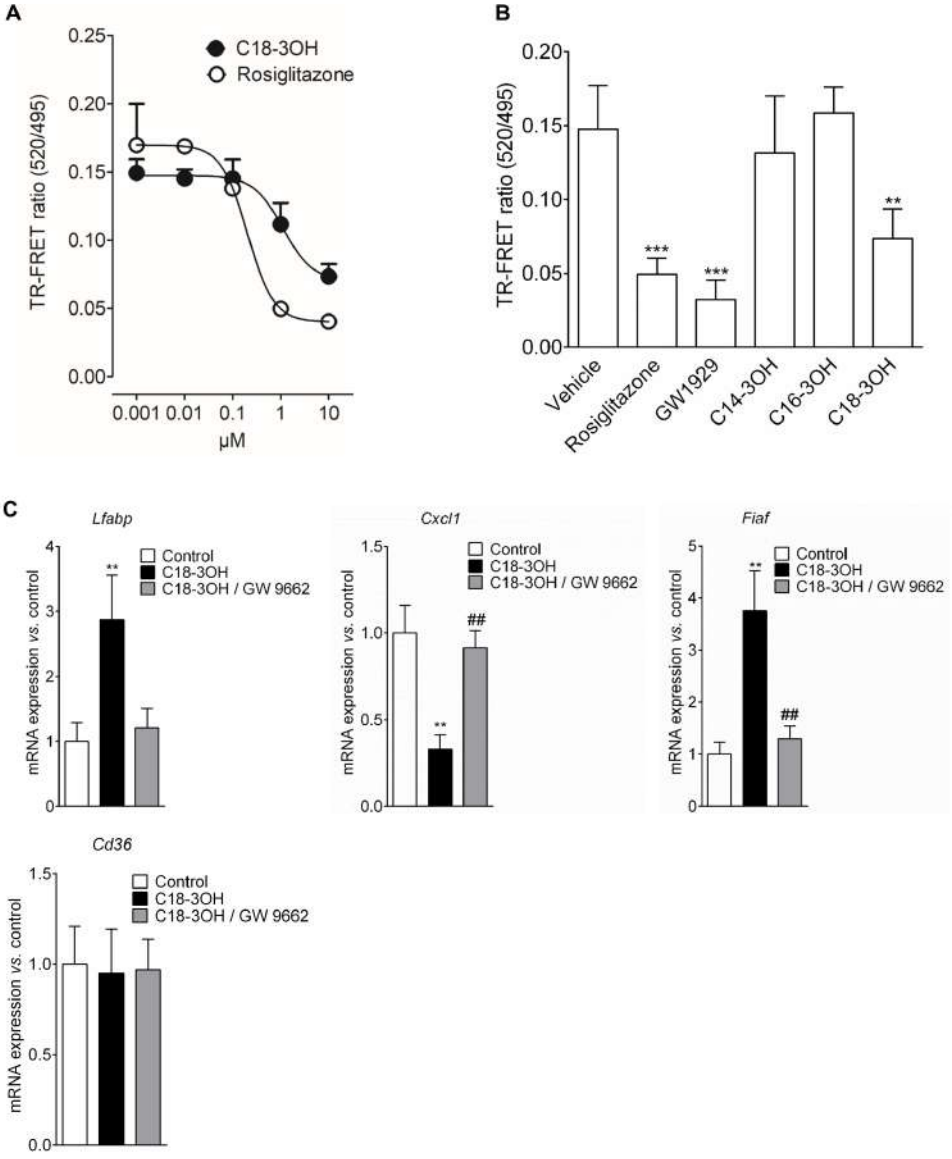


Figure 5 C18-3OH and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactions. (A) The binding affinity of 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 µM of C18-3OH or rosiglitazone for peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARγ) was determined by the competitive binding assay. Data are expressed as mean±SEM. n=5 independent experiments. (B) The binding affinity of C14-3OH (10 µM), C16-3OH (10 µM), C18-3OH (10 µM), rosiglitazone (10 µM), GW1929 (1 µM) or their vehicle (dimethyl sulfoxide (DMSO) 2%) was determined by the competitive binding assay. Data are expressed as mean±SEM. n=3–5 independent experiments. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from vehicle. (C) mRNA of *Lfabp*, *Cxcl1* and *Fiaf* were quantified in colon of mice gavaged during 7 days with C18-3OH (100 µM/ 100 µL; black and grey bars) or its vehicle (control, white bars) and treated by intraperitoneal injection of GW9662 (1 mg/kg, grey bar) or its vehicle (black bar) by quantitative real-time PCR. mRNA content was normalised to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA and quantified relative to the control group. Data are expressed as mean±SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. **p<0.01, significantly different from control group and ## p<0.01, significantly different from C18-3OH group.

to impair EcN probiotic activity[26] did not change the production of C18-3OH compared with wild-type bacteria meaning that the pks island is not implicated in C18-3OH synthesis. In *E. coli*, LCFA are generated by synthases, dehydratases and a reductase and are incorporated into the cell membrane[27] or secreted in the medium as shown in our study. The mechanism implicated in the secretion of this LCFA-3OH still needs to be studied.

Similarly to the probiotic approach, the use of FOS as a prebiotic has previously been shown to have anti-inflammatory effects in rodent models of colitis,[28–30] and to improve the gut barrier function.[28 31] These effects have been correlated to changes in microbial community and microbial metabolites induced by FOS.[20 31] Among these bacterial metabolites, we assessed the impact of FOS diet on C18-3OH production. We demonstrated that the oral administration of FOS in DSS mice induced a reduction of colitis associated with an improvement of gut permeability. Furthermore, it was accompanied by an increased C18-3OH production in the colonic tissue and a change in microbial taxonomy. In particular, we showed an increased abundance of *Akkermansia*, *Holdemanella*, *Allobaculum* and *Parabacteroides* genera in the caecum of DSS mice treated with FOS. In a previous study, we demonstrated that FOS feeding

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

specifically increases the abundance of three of these genera (ie, *Akkermansia*, *Allobaculum* and *Parabacteroides*), decreases inflammatory tone and reinforces the gut barrier function on diet-induced obesity and diabetes.[32] In the current study, the abundance of *Holdemanella*, *Allobaculum* and *Parabacteroides* was positively correlated with the production of C18-3OH in the colon. Among this three genera, *Holdemanella* was the most abundant and *H. biformis*, previously misclassified as *Eubacterium biforme*,[33] is the only strain described in this genus. This bacterium, present in human faeces,[34 35] contains high concentrations of fatty acids with 18 carbons compared with their closer phylogenetic neighbours of the family *Erysipelotrichaceae*.[33] Interestingly, *H. biformis* was able to produce C18-3OH in larger quantities than EcN, suggesting that *H. biformis* might be more effective regarding C18-3OH-mediated anti-inflammatory activity.

We then investigated, the mechanism involved in the anti-inflammatory effect of C18-3OH. A number of preclinical mouse models of inflammation including DSS-induced colitis reported that inflammatory parameters (eg, *Cxcl1* and *Reg3γ*) were reduced following treatment with a LCFA of 18 carbons as well as a PPARγ agonist in vivo.[36–38] As C18-3OH enters epithelial cells, we hypothesised that it could interact with the PPARγ, which is an intracellular receptor strongly expressed in the colon[39] and that may potentially bind hydroxylated LCFA of 18 carbons.[40] In line with our hypothesis, C18-3OH treatment and FOS diet during colitis (figures 2 and 3 and online supplemental figures 5,7) reduced the concentrations of EET issued from the metabolism of arachidonic acid by cytochrome epoxygenases[41] which are decreased in adipocytes overexpressing PPARγ or following treatment of primary culture of hepatocytes by PPARγ agonists.[42–45] Moreover, the significant increase in abundance of *Escherichia* observed in inflammatory condition was not present in the FOS/DSS group (figure 3C and online supplemental figure 9) as shown in a recent study which demonstrates that increasing PPARγ activity in the gut modulates microbiota by decreasing *Enterobacteriaceae*[46] (eg, pathogenic *E. coli*) in colitis. TR-FRET experiments showed that the C18-3OH is a PPARγ ligand. Gavage of naïve mice with C18-3OH recapitulated the consequences of pharmacological or physiological activation of PPARγ in epithelial cells or colonic tissue as reported elsewhere.[37 38 47] However, whether the activation of PPARγ signalling in the intestinal epithelial cells is the driving mechanism needs to be studied further.

C18-3OH administration could be a treatment in IBD patients for the control of intestinal inflammation during remission periods, as shown with other PPARγ agonists such as 5-aminosalicylic acid (5-ASA).[22 48 49] In addition, C18-3OH does not cross the epithelial intestinal barrier leading to a local anti-inflammatory effect, and thus, should not lead to the systemic adverse effects reported by IBD patients treated with 5-ASA, such as headache, rash or bronchitis.[50] The advantage of using probiotics compared with a drug is that it could exerts its anti-inflammatory effect by different mechanisms, thus if one of the anti-inflammatory pathways is not functional, due to tissue damage, for instance, they still could have an effect on the colitis. In addition, probiotics are associated with less side effects than drugs used against inflammation. While the use of EcN in UC patients has been described, the therapeutic efficacy of *H. biformis* has never been investigated in preclinical or clinical studies in the treatment of colonic inflammation. Our study is the first to show that this strain could have therapeutic effects in IBD. Interestingly, both *H. biformis* and PPARγ, have recently been reported as having anti-tumourigenic effects in the colon, thus suggesting that perhaps the C18-3OH could have a broader probiotic role and exert beneficial effects in colorectal cancer treatment.[51] Recently, a pilot trial showed that the association of a FOS prebiotic mixture with a probiotic *Bifidobacterium longum* resulted in improvement of the appearance of chronic inflammation in patients with active UC.[52 53] The same approach using FOS coupled to EcN and/or *H. biformis* could be an interesting therapeutic approach in IBD regarding the anti-inflammatory effects found in our study.

Together our findings, highlights the implication of LCFA-3OH in the effects of the gut microbiota on the host. The release of LCFA-3OH and not solely of C18-3OH by bacteria, could participate to the dialogue between bacteria and their host, and potentially represent a new beneficial treatment of flares and maintaining remission in patients with IBD.

Author affiliations
[1]IRSD, INSERM, INRA, INP-ENVT, Toulouse University 3 Paul Sabatier, Toulouse, France
[2]Farncombe Family Digestive Health Institute, McMaster University Faculty of Health Sciences, Hamilton, Ontario, Canada
[3]MetaToulLipidomics Facility, INSERM UMR1048, Toulouse, France
[4]Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium
[5]Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology (WELBIO), Louvain Drug Research Institute, Metabolism and Nutrition Research Group, UCLouvain, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium
[6]Centre for Pathophysiology Toulouse-Purpan (CPTP), INSERM, CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France
[7]Service de bactériologie-hygiène, CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France
[8]NeuroMicrobiota, European Associated Laboratory (EAL), INSERM/UCLouvain, Toulouse, Brussels, France, Belgium

Twitter Patrice D Cani @MicrObesity

Acknowledgements We gratefully acknowledge the animal care facility, Genetoul, anexplo, US006/INSERM, Toulouse, the Toulouse INSERM Metatoul-Lipidomique Core Facility-MetaboHub ANR-11-INBS-010, where lipidomic analysis were performed, and the platform Aninfimip, an EquipEx ('Equipement d'Excellence') supported by the French government through the Investments for the Future programme (ANR-11-EQPX-0003).

Contributors JLFP and CP designed and conducted experiments, performed data acquisition, analysis and interpretation, and wrote the manuscript. PLF designed and conducted experiments, performed data acquisition, analysis and interpretation and drafting of the manuscript. VE, GP, SM, TP-B, MVH, FB and CB carried out experiments, performed data acquisition, analysis. SC and FVI conducted experiments and contributed with the drafting of the manuscript. JB-M and EO contributed to data analysis and interpretation and edition of the manuscript. GD participated in the manuscript writing. PDC designed experiments, performed interpretation of data, helped with manuscript drafting and supervised microbiota study. NC designed and conducted experiments, performed analysis and interpretation of data, wrote the manuscript and directed the project.

Funding NC is a recipient of the grant from ANR (ANR-18-CE14-0039-01). PDC is a senior research associate at FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) and recipient of grants from FNRS (WELBIO-CR-2019C-02R, 'The Excellence Of Science: EOS 30770923') and the Funds Baillet Latour (Grant for Medical Research 2015). CK is a recipient of the grant from ANR (ENDIABAC, ANR-18-CE14-0007-01).

Competing interests None declared.

Patient and public involvement Patients and/or the public were not involved in the design, or conduct, or reporting, or dissemination plans of this research.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval All procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the European Council and were approved by the Animal Care and Ethics Committee of US006/CREFE (CEEA-122; application number APAFIS #7762-CE2016112509278235V2).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information.

ORCID iDs
Claude Knauf http://orcid.org/0000-0001-5213-5378

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

Patrice D Cani http://orcid.org/0000-0003-2040-2448
Nicolas Cenac http://orcid.org/0000-0002-1552-7812

REFERENCES

1 Rondanelli M, Faliva MA, Perna S, *et al*. Using probiotics in clinical practice: where are we now? A review of existing meta-analyses. *Gut Microbes* 2017;8:521–43.
2 Henker J, Laass M, Blokhin BM, *et al*. The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr* 2007;166:311–8.
3 Schippa S, Conte MP. Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *Nutrients* 2014;6:5786–805.
4 Collins SM. A role for the gut microbiota in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:497–505.
5 Schultz M, Strauch UG, Linde H-J, *et al*. Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:372–8.
6 Souza Éricka L, Elian SD, Paula LM, *et al*. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. *J Med Microbiol* 2016;65:201–10.
7 Barbaro MR, Fuschi D, Cremon C, *et al*. Escherichia coli Nissle 1917 restores epithelial permeability alterations induced by irritable bowel syndrome mediators. *Neurogastroenterol Motil* 2018:e13388.
8 Wang Y, Sun L, Chen S, *et al*. The administration of Escherichia coli Nissle 1917 ameliorates irinotecan-induced intestinal barrier dysfunction and gut microbial dysbiosis in mice. *Life Sci* 2019;231:116529.
9 Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, *et al*. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. *Nat Commun* 2017;8:1314.
10 Oursel D, Loutelier-Bourhis C, Orange N, *et al*. Identification and relative quantification of fatty acids in Escherichia coli membranes by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:3229–33.
11 Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, *et al*. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* 1997;277:1453–62.
12 Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, *et al*. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 2005;128:891–906.
13 Johnson JR, Weissman SJ, Stell AL, *et al*. Clonal and pathotypic analysis of archetypal Escherichia coli cystitis isolate NU14. *J Infect Dis* 2001;184:1556–65.
14 Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 2001;69:4572–9.
15 Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, *et al*. Pyelonephritogenic Escherichia coli and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* 1990;58:1281–9.
16 Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT, *et al*. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among Escherichia coli isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* 2002;185:774–84.
17 Lindberg U, Claesson I, Hanson LA, *et al*. Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. *Acta Paediatr* 1975;64:425–31.
18 Secher T, Payros D, Brehin C, *et al*. Oral tolerance failure upon neonatal gut colonization with Escherichia coli producing the genotoxin colibactin. *Infect Immun* 2015;83:2420–9.
19 Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C, *et al*. Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 2012;3:501–9.
20 Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, *et al*. 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* 2017;14:491–502.
21 Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014;510:92–101.
22 Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, *et al*. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617–23.
23 Floch MH, Walker WA, Madsen K, *et al*. Recommendations for probiotic use-2011 update. *J Clin Gastroenterol* 2011;45 Suppl:S168–71.
24 Grabig A, Paclik D, Guzy C, *et al*. Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun* 2006;74:4075–82.
25 Hafez M, Hayes K, Goldrick M, *et al*. The K5 capsule of Escherichia coli strain Nissle 1917 is important in stimulating expression of Toll-like receptor 5, CD14, MyD88, and TRIF together with the induction of interleukin-8 expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in epithelial cells. *Infect Immun* 2010;78:2153–62.
26 Massip C, Branchu P, Bossuet-Greif N, *et al*. Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of Escherichia coli Nissle 1917. *PLoS Pathog* 2019;15:e1008029.
27 Cronan JE, Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol* 2009;459:395–433.
28 Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, *et al*. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009;58:1091–103.
29 Rastelli M, Cani PD, Knauf C. The gut microbiome influences host endocrine functions. *Endocr Rev* 2019;40:1271–84.
30 Winkler J, Butler R, Symonds E. Fructo-oligosaccharide reduces inflammation in a dextran sodium sulphate mouse model of colitis. *Dig Dis Sci* 2007;52:52–8.
31 Everard A, Lazarevic V, Derrien M, *et al*. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 2011;60:2775–86.
32 Everard A, Lazarevic V, Gaïa N, *et al*. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *Isme J* 2014;8:2116–30.
33 De Maesschalck C, Van Immerseel F, Eeckhaut V, *et al*. Faecalicoccus acidiformans gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of Streptococcus pleomorphus (Barnes et al. 1977), Eubacterium biforme (Eggerth 1935) and Eubacterium cylindroides (Cato et al. 1974) as Faecalicoccus pleomorphus comb. nov., Holdemanella biformis gen. nov., comb. nov. and Faecalitalea cylindroides gen. nov., comb. nov., respectively, within the family Erysipelotrichaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:3877–84.
34 Schwiertz A, Le Blay G, Blaut M. Quantification of different Eubacterium spp. in human fecal samples with species-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:375–82.
35 Kageyama A, Benno Y. Rapid detection of human fecal Eubacterium species and related genera by nested PCR method. *Microbiol Immunol* 2001;45:315–8.
36 Choo J, Lee Y, Yan X-J, *et al*. A Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)γ Agonist 2-Hydroxyethyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate Exerts Anti-Inflammatory Effects in Colitis. *J Biol Chem* 2015;290:25609–19.
37 Harmon GS, Dumlao DS, Ng DT, *et al*. Pharmacological correction of a defect in PPAR-gamma signaling ameliorates disease severity in Cftr-deficient mice. *Nat Med* 2010;16:313–8.
38 Duszka K, Picard A, Ellero-Simatos S, *et al*. Intestinal PPARγ signalling is required for sympathetic nervous system activation in response to caloric restriction. *Sci Rep* 2016;6:36937.
39 Thompson EA. Ppargamma physiology and pathology in gastrointestinal epithelial cells. *Mol Cells* 2007;24:167–76.
40 Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. Ppars are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:1007–22.
41 Capdevila JH, Falck JR, Estabrook RW. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *Faseb J* 1992;6:731–6.
42 Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, *et al*. Adipocyte-Specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 2003;278:498–505.
43 Rogue A, Lambert C, Jossé R, *et al*. Comparative gene expression profiles induced by PPARγ and PPARα/γ agonists in human hepatocytes. *PLoS One* 2011;6:e18816.
44 Rifkind AB, Lee C, Chang TK, *et al*. Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1995;320:380–9.
45 Tsao CC, Coulter SJ, Chien A, *et al*. Identification and localization of five CYP2Cs in murine extrahepatic tissues and their metabolism of arachidonic acid to regio- and stereoselective products. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:39–47.
46 Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, *et al*. Microbiota-activated PPAR-γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* 2017;357:570–5.
47 Gupta RA, Brockman JA, Sarraf P, *et al*. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:29681–7.
48 Williams C, Panaccione R, Ghosh S, *et al*. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2011;4:237–48.
49 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, *et al*. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635–9.
50 Sehgal P, Colombel J-F, Aboubakr A, *et al*. Systematic review: safety of mesalazine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2018;47:1597–609.
51 Zagato E, Pozzi C, Bertocchi A, *et al*. Endogenous murine microbiota member Faecalibaculum rodentium and its human homologue protect from intestinal tumour growth. *Nat Microbiol* 2020;5:511–24.
52 Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, *et al*. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005;54:242–9.
53 Marteau P. Probiotics, prebiotics, synbiotics: ecological treatment for inflammatory bowel disease? *Gut* 2006;55:1692–3.

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2020-321173 on 25 September 2020. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on November 11, 2020 at INSERM Consortia. Protected by copyright.

A bacterial-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis

Julien Pujo[1,#,*], Camille Petitfils[1,*], Pauline Le Faouder[2], Venessa Eeckhaut[3], Gaëlle Payros[1], Sarah Maurel[1], Teresa Perez-Berezo[1], Matthias Van Hul[4], Frédérick Barreau[1], Catherine Blanpied[1], Stéphane Chavanas[5], Filip Van Immerseel[3], Justine Bertrand-Michel[2], Eric Oswald[1,6], Claude Knauf[1,7], Gilles Dietrich[1], Patrice D. Cani[4,7], Nicolas Cenac[1,&]

[1] IRSD, INSERM, INRA, INP-ENVT, Toulouse University 3 Paul Sabatier, Toulouse, France

[2] MetaToulLipidomics Facility, INSERM UMR1048, Toulouse, France

[3] Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium

[4] UCLouvain, Université catholique de Louvain, WELBIO- Walloon Excellence in Life Sciences and BIOtechnology, Louvain Drug Research Institute, Metabolism and Nutrition Research Group, Brussels, Belgium.

[5] Centre for Pathophysiology Toulouse-Purpan (CPTP), INSERM, CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France.

[6] CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-hygiène, Toulouse, France

[7] NeuroMicrobiota, European Associated Laboratory (EAL) INSERM/UCLouvain.

* Joint first author

[#] current address: Farncombe Family Digestive Health Institute, McMaster University, Hamilton, Canada

Index

Supplementary methods……..…….....2

Supplementary results…….……..12

Supplementary tables……..……..…….13

Supplementary figures…….…….……15

Supplementary references……...……...…30

Supplementary methods

Escherichia coli culture

One strain of *Escherichia coli* from the phylogenetic group A (MG1655) and eight strains from the phylogenetic group B2 including five pathogens (NC101, NU14, UTI, CFT, SP15), one asymptomatic (ABU), one commensal (M1/5) and one probiotic (EcN) were grown in agar LB plate for 12 to 18 hours at 37 °C (supplementary table 1). For each strain, a colony was grown in 3 mL of medium LB for 12 to 18 hours at 37 °C, then the volume corresponding to 0.1 unit of OD at 600 nm was seeded in 10 mL of Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 4.5 g/L of D-glucose, L-glutamine and 25 mM of HEPES during 8 hours before lipid extraction.

Holdemanella biformis culture

After growing *Holdemanella biformis* (DSM3989) for 72h in M2GSC broth (ATCC Medium: 2857) at 37°C in an anaerobic (80% N_2, 10% CO_2 and 10% H_2) workstation (GP-Campus, Jacomex, TCPS NV, Rotselaar, Belgium), the culture was streaked onto an agar plate containing M2GSC medium with 1,5% agar. After 48h incubation, DNA was extracted from the obtained colonies and PCR amplicons of the 16S rRNA gene were sent for Sanger sequencing to Eurofins Genomics Sequencing Europe (Konstanz, Germany) for confirmation of the species identity. Five broth cultures were grown for 72h; each culture was then diluted 1:25 into 10ml fresh M2GSC medium. After 48h of incubation at 37°C the cultures were centrifuged for 15min at 2319 x g at room temperature. Pellets and supernatant were stored at -20°C.

Extraction of bacterial lipids

Bacterial cultures were centrifuged at 755 g for 15 min and the recovered bacterial pellets were immediately crushed with a FastPrep-24 Instrument (MP Biomedical, Fisher scientific SAS, Illkirch, France) in 200 µL HBSS (Invitrogen) and 5 µL internal standard (IS) mixture (Deuterium-labeled compounds) (400 ng mL^{-1}). After two crush cycles (6.5 ms^{-1}, 30 s), 10 µL of suspensions were withdrawn for protein quantification and 0.3 mL of cold methanol (MeOH) were added. In parallel, bacteria culture supernatants were filtered through a 0.22-µm pore size filter (Merck Chimie SAS, Fontenay Sous Bois, France) to remove residual bacterial cells, and 1mL of supernatant was collected for lipid extraction after addition of 5 µL IS mixture and 0.3 mL of cold MeOH. Both bacteria and supernatant samples were centrifuged at 1016 × g for 15 min (4 °C) and the resulting supernatants were submitted to solid phase extraction of lipids using HLB plate (OASIS® HLB mg, 96-well plate, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Briefly, plates were conditioned with 500 µL MeOH and 500 µL H_2O/MeOH (90:10, v/v). Samples were loaded at a flow rate of about one drop per 2 s and, after complete loading, columns were washed with 500 µL H_2O/MeOH (90:10, v/v). The columns were thereafter dried under aspiration and lipids were eluted with 750 µL MeOH. Solvent was evaporated under N2 and samples were resuspended with 140 µL MeOH and transferred into a vial (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Finally, the 140µL of methanol were evaporated and our sample resuspended with 10 µL of methanol for liquid chromatography/mass spectrometry analysis

Identification of hydroxylated long chain fatty acid

MS and MS/MS analyses were performed in the negative ion FTMS mode at a resolution of 30,000 (at m/z 400) with the following source parameters: capillary temperature was 325 °C, source heater temperature was 300 °C, sheath gas flow rate was 30 a.u. (arbitrary unit), auxiliary gas flow rate was 10 (a.u.), and source voltage was −2.9 kV. Samples were injected on a ZorBAX SB 120 C18 column (2.1 × 100 mm, 2.7 µm) (Agilent Technologies) maintained at 40 °C. Solvent A was 0.1% formic acid in H_2O and solvent B was 0.1% formic acid in

acetonitrile at a flow rate of 350 µL min^{-1}. The multistep gradient was as follows: 25% B at 0 min, 40% B at 10 min, 47.5% B at 10.1 min, 73.8% B at 21 min, 100% B at 21.2 min, 100% B at 23.2 min, 25% B at 23.4 min, and 25% B at 25.4 min. The autosampler was set at 5 °C and the injection volume was 5 µL. The identification and the data processing were performed using XCalibur software (Thermo Fisher Scientific). The MS/MS experiments were performed by using collisional activation within non-resonant excitation mode (HCD32). The excitation energy was optimized in the range of the 20 and 35% NCE such as the precursor ion survived to the dissociation processes within a relative abundance between 30 and 150% of the most abundant product ion displayed in the HCD spectrum recorded with a resolution of 30,000.

Quantification of hydroxylated long chain fatty acid

In bacteria, we quantified C8-3OH, 12-TriHOME, 10-TriHOME, C10-3OH, C12-3OH, 12,13-DiHOME, 9,10-DiHOME, 9-HOTrE, 13-HOTrE, 13-HODE, 9-HODE, C14-3OH, 13-OxoODE, 9-Oxo-ODE, C16:1-3OH, C16-3OH, C18:1-3OH and C18-3OH (supplementary Table 2). All the standards were purchased from Avanti® Polar Lipids (Merck – Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The quantification of hydroxylated long chain fatty acid was performed on a high-performance liquid chromatography (Agilent 1290 Infinity) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (G6460 Agilent). Samples were injected on a ZorBAX SB 120 C18 column (2.1 × 100 mm, 2.7 µm) (Agilent Technologies) maintained at 40 °C. Solvent A was 0.1% formic acid in H_2O and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile at a flow rate of 350 µL min^{-1}. The linear gradient was as follows: 30% B at 0 min, 85% B at 15 min, 100% B at 15.1 min, 100% B at 16.5 min, and 30% B at 16.7 min. The autosampler was set at 5 °C and the injection volume was 5 µL. The HPLC system was coupled online to an Agilent 6460 triple quadrupole MS (Agilent Technologies) equipped with an ESI source. ESI was performed in negative ion mode. Source parameters used were as follows: source temperature was set at 325 °C, nebulizer gas (nitrogen) flow rate was 10 L min−1, sheath gas temperature

was 400 °C, sheath gas (nitrogen) flow rate was 12 L min−1, and the spray voltage was adjusted to −3.5 kV. Analyses were performed in Selected Reaction Monitoring detection mode (SRM) using nitrogen as collision gas. Ion optics and collision energy were optimized for each hydroxylated fatty acid (supplementary table 2). In order to increase the sensibility, the mass method was segmented and the dwell times were optimized for each segment. Finally, peak detection, integration and quantitative analysis were done using MassHunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies).

Colitis induction and study design

For all *in vivo* colitis studies, 4 groups of 5 mice were used per experiment and replicated 3 times. Dextran sulfate sodium (DSS; molecular weight, 40 kDa; MP Biomedicals, Fisher Scientific, Illkirch, France) colitis was induced in C57Bl/6J mice that, for 7 days, received 3% DSS dissolved in their drinking water. No mortality was observed during the 7 days of DSS administration in all groups. Development of colitis was assessed daily by measurement of the body weight. Paracellular permeability, macroscopic and microscopic damage score were evaluated after 7 days of DSS. Colonic tissue samples were also harvested to perform RT-qPCR and polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites quantification.

In a first set of experiments, mice were gavaged every day for 9 days (2 days before and during the 7 days of DSS treatment) with 100 µM of C18-3OH (Avanti® Polar Lipids, Merck – Sigma Aldrich) solubilized in 100 µL of PBS/ethanol 3% or with the vehicle (PBS/ethanol 3%). In a second series of experiment, mice received fructooligosaccharides (10%, FOS; Beneo-Orafti, Oreye, France) in the drinking water for 10 days (3 days before and during the 7 days of DSS treatment). For these second series of experiment, abundance of bacteria genera in caecal microbiota was determined.

Paracellular permeability, macroscopic and microscopic score assessment

To determine paracellular permeability, at the end of the DSS-treatment, mice were gavaged with dextran 4kDa-FITC (25 mM; Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Four hours after, mice were sacrificed blood was collected for FITC quantification in the serum and the colons were removed. Length and thickness were measured and macroscopic colonic tissue damages were scored from 0 to 3 for the intensity of adhesion and strictures, from 0 to 2 for the intensity of oedema, erythema, ulceration and diarrhoea and from 0 to 1 (absent or present) for the mucus, haemorrhage and faecal blood; the maximal score being 17. For histological examination, a specimen of colon located at 2 cm proximal to the anus was resected, fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin–eosin. Slides were examined and graded for cellular infiltration, mucosal architecture alteration and submucosal oedema from 0 to 3 (absent, mild, moderate and severe) and vasculitis, muscular thickening, crypt abscess and goblet cell depletion from 0 to 1 (absent or present); the maximal score being 13.

Real time PCR analysis

Colon biopsies were crushed in 500 mL of Trizol (Molecular Research Center, Euromedex, Souffelweyersheim, France) in Precellys lysing kit tubes (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, France) placed in a Precellys (2823g, 30 seconds twice; Bertin Technologies). After addition of chloroform and centrifugation (15 minutes, 1019 g at 4°C), the supernatant containing the RNA was removed. Ethanol 70% (vol/vol) was added and the contents were placed in columns (GenElute® mammalian total RNA miniprep kit, Sigma Aldrich). The RNA was extracted according to the manufacturer recommendations. Subsequently the RNA were dosed in a nanodrop (implenGmbH, Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). RNA (10 µg) preparations from colon of DSS mice were purified using the kit (Dynabeads® mRNA purification kit, Fisher Scientific, Illkirch France) according to the manufacturer recommendations. Then, total RNA was reverse-transcribed with Moloney murine leukemia

virus reverse transcriptase (Fisher Scientific) using random hexamers (Fisher Scientific) for priming. Transcripts encoding hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*Hprt*), trefoil factor 3 (*Tff3*), *mucin 2* (*Muc2*), occludin, zonula occludens-1 (*Tjp1*), regenerating islet-derived 3 gamma (*Reg3γ*), matrilysin (*Mmp7*), tumor necrosis factor alpha (*Tnfα*), chemokine (C-C motif) ligand 5 (*Ccl5*), transforming growth factor beta (*Tgfβ*), interleukin 6 (*Il6*), *Il1β*, nuclear factor kappa B (*Nfκb*), chemokine (C-X-C motif) 1 ligand (*Cxcl1*), *Cxcl2*, fasting-inducing adipocyte factor (*Fiaf*) and liver-fatty acid binding protein (*Lfabp*) were quantified by real-time PCR using specific forward and reverse primers (supplementary table 3), the kit Takyon No ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogentec) and the LightCycler480II (Roche Diagnostics, Meylan, France).

PUFA metabolites LC-MS/MS measurements

PUFA metabolites were extracted following the methods previously described for bacterial lipids. 6-keto-prostaglandin F1 alpha (6kPGF$_{1\alpha}$), thromboxane B2 (TxB$_2$), PGE$_2$, 8-isoPGA$_2$, PGE$_3$, 15d-PGJ$_2$, PGD$_2$, lipoxin A4 (LxA$_4$), LxB$_4$, resolvin D1 (RvD1), RvD2, RvD5, 7-Maresin 1 (7-Mar1), leukotriene B4 (LtB$_4$), LtB5, protectin Dx (PDx), 18-hydroxyeicosapentaenoic (18-HEPE), 5,6-dihydroxyeicosatetraenoic acid (5,6-DiHETE), 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE), 13-HODE, 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 12-HETE, 8-HETE, 5-HETE, 17-hydroxydocosahexaenoic acid (17-HDoHE), 14-HDoHE, 14,15-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET), 11,12-EET, 8,9-EET, 5,6-EET, and 5-oxoeicosatetraenoic acid (5-oxoETE) were quantified in mouse colons.[1] To simultaneously separate 31 lipids of interest and three deuterated internal standards (5-HETEd8, LxA$_4$d4 and LtB$_4$d4), LC-MS/MS analysis was performed on an ultrahigh-performance liquid chromatography system (UHPLC; Agilent LC1290 Infinity) coupled to an Agilent 6460 triple quadrupole MS (Agilent Technologies) equipped with electrospray ionization operating in negative mode. Reverse-phase UHPLC was performed using a ZorBAX SB-C18 column

(Agilent Technologies) with a gradient elution. The mobile phases consisted of water, acetonitrile (ACN), and formic acid (FA) [75:25:0.1 (v/v/v)] (solution A) and ACN and FA [100:0.1 (v/v)] (solution B). The linear gradient was as follows: 0% solution B at 0 min, 85% solution B at 8.5 min, 100% solution B at 9.5 min, 100% solution B at 10.5 min, and 0% solution B at 12 min. The flow rate was 0.35 ml/min. The autosampler was set at 5°C, and the injection volume was 5 µL. Data were acquired in multiple reaction monitoring (MRM) mode with optimized conditions. Peak detection, integration, and quantitative analysis were performed with MassHunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies). For each standard, calibration curves were built using 10 solutions at concentrations ranging from 0.95 to 500 ng/ml. A linear regression with a weight factor of 1/X was applied for each compound. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined for the 28 compounds using signal-to-noise (S/N) ratios. The LOD corresponded to the lowest concentration leading to an S/N value >3, and LOQ corresponded to the lowest concentration leading to an S/N value >10. All values less than the LOQ were not considered. Blank samples were evaluated, and their injection showed no interference (no peak detected), during the analysis. Hierarchical clustering was performed, and heat maps were obtained with R (www.r-project.org). PUFA metabolite amounts were transformed to z scores and clustered based on 1 − Pearson correlation coefficient as distance and the Ward algorithm as agglomeration criterion.

Microbiota analysis

DNA isolation from mouse caecal samples for sequencing

Caecal contents were collected and frozen at -80°C until use. Ten caecal contents per groups were randomly chosen between the 3 independent experiments. Metagenomic DNA was extracted from the caecal content using a QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with modifications.[2]

Bacterial DNA sequencing

The bacterial 16S rRNA gene was amplified using barcoded primers V4 variable region PCR primers 515/806. After amplification, PCR products are checked in 2% agarose gel to determine the success of amplification and the relative intensity of bands. Purified PCR product is used to prepare Illumina DNA library. Sequencing was performed at MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA) on a MiSeq (Illumina) following the manufacturer's guidelines. Sequence data were processed using MR DNA analysis pipeline (MR DNA, Shallowater, TX, USA). In brief, sequences were joined, depleted of barcodes then sequences <150bp removed, sequences with ambiguous base calls removed. Sequences were denoised, OTUs generated and chimeras removed. Operational taxonomic units (OTUs) were defined by clustering at 3% divergence (97% similarity). Final OTUs were taxonomically classified using BLASTn against a curated database derived from RDPII and NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov, http://rdp.cme.msu.edu). The analysis was completed using the Qiime2 microbiome bioinformatics pipeline (https://qiime2.org/).

Cell Culture

Caco2 cells (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, catalogue number: ACC 169) were cultured in DMEM medium with Glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Fisher Scientific) and 1% antibiotics (100 U ml^{-1} penicillin and 100 mg mL^{-1} streptomycin; Invitrogen) at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. When 70% confluence was reached, 100 000 caco2 cells were plated on Transwell inserts (Costar, Sigma Aldrich). After 15 days the measurement of paracellular permeability was performed. Dextran 4kDa-FITC (15 µM) was added on the apical side, and 24 hours after incubation, the intensity of basolateral and apical fluorescence was quantified at the excitation wavelength of 485 nm and the emission wavelength of 520 nm by a Varioskan Flash microplate reader (Fisher Scientific). The cells were considered differentiated when less than 5% dextran 4kDa-FITC was found on the

basolateral side. Once differentiated, the cells were cultivated in serum-free medium and treated or not with C18-3OH (1, 10 or 100µM) solubilized in 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich) and then a lipid extraction of apical and basolateral supernatants and cells was carried out after 30 minutes, 2 hours, 6 hours, 12 hours and 24 hours of incubation. The compound C18-3OH was quantified in apical, basolateral side and in cells by LC-MS/MS. The effect of C18-3OH (1, 10 and 100 µM) on paracellular permeability was quantified by the measure of dextran 4kDa-FITC flux through the monolayer of caco2 cells.

Ussing chambers

Colon and ileum biopsies or Peyer patches were mounted in Ussing chambers exposing 0.196 cm^2 of tissue surface to 1.5 mL of circulating oxygenated Krebs Ringer solution (NaCl 6.72g, $NaHCO_3$ 2.10g, 50mL of solution 1 ($MgCl_2$ 4.82g and $CaCl_2$ 3.52g qs 1L), 100 mL of solution 2 (K_2HPO_4 4.16g and KH_2PO_4 0.54g qs 1L) at 37°C. To study the passage through the intestinal epithelium of C18-3OH, 1 or 100 µM of C18-3OH solubilized in Krebs Ringer was added to the luminal compartment. One hour after incubation the luminal and serosal compartments and biopsies were removed to quantify C18-3OH by LC-MS/MS. In parallel, intestinal paracellular permeability in response or not to 1 and 100 µM of C18-3OH was assessed by measuring the mucosal-to-serosal flux of 4kDa FITC-dextran (15µM).

C18-3OH gavage in control mice.

Oral administration of C18-3OH (100µM;100µL) or its vehicle (PBS, 100µL) was performed daily during 7 days in mice. At day 7, mice were sacrificed at 30 minutes, 2 hours and 4 hours after the last gavage. Blood, ileum, Peyer patches and colon were collected in order to quantify the C18-3OH by LC-MS/MS. In a second set of experiments, mice were gavaged with C18-3OH as described above and were treated during 7 days by intraperitoneal administration of GW9662 (1 mg/kg; Interchim, Montluçon, France), an antagonist of PPARγ, or its vehicle

(HBSS). Two hours after the last gavage, colons were harvested in order to perform real time PCR analysis of *Lfabp*, *Cxcl1*, *Fiaf* and *Cd36* (supplementary table 3).

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) competitive ligand binding assay

The LanthaScreen time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) PPARγ competitive binding assay (Fisher scientific) was performed according to the manufacturer's protocol. Serial concentrations of rosiglitazone, C18-3OH, C16-3OH, C14-3OH, GW1929, a PPARγ agonist or their vehicle (DMSO 2%) were incubated with GST-fused human PPARγ-LBD, terbium-labeled anti-GST antibody, and a fluorescently labelled PPAR ligand (Pan-PPAR Green tracer) for 6 h in the dark at room temperature. The FRET signal was measured by excitation at 340 nm and emission at 520 nm for fluorescein and 495 nm for terbium. In this assay, test compounds binding to PPARγ-LBD competed with Pan-PPAR Green tracer and replaced it, resulting in a decrease of signal. The ability to bind to the PPARγ-LBD was measured by the decrease of the 520 nm/495 nm ratio using an EnSight^{TM} multimode Plate Reader (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France).

Statistical analysis

Data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Comparisons between-groups were performed by Mann-Whitney test. Multiple comparisons within groups were performed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test or by two-way Anova followed by Bonferroni post-test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$. The heat map was performed with the R software (www.r-project.org).

Supplementary results: Identification of hydroxylated fatty acids produced by EcN.

In order to characterize the bacterial long chain fatty acid (LCFA) potentially implicated in probiotic properties of the probiotic strain, EcN, we performed an analysis of free fatty acid by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) of lipids extracted from EcN. The total ion chromatograms (TIC) obtained from the electrospray ionization (ESI) was used to reveal the lipids with the higher concentration (supplementary figure 1A). The higher peak eluted at 14.84 min correspond to the C14AsnOH at m/z 341.27 as previously described.[3] For the peak eluted at 15.98 min, with the accurate m/z ratio 243.1959, we determined an elemental composition of the deprotonated molecule like $[(C_{14}H_{28}O_3)\text{-}H]^-$. Then, the natural isotopic profile of the molecular species in the experimental mass spectrum obtained at 15.98 min was compared to its simulation generated from the formula (calculated: m/z 243.1961). These two isotopic profiles were similar and the accuracy of the m/z measurements of monoisotopic peak was 0.8 ppm (supplementary figure 1B), as well as the m/z measurements of its first major natural isotopic $[(^{13}CC_{13}H_{28}O_3)\text{-}H]^-$ peak supporting the proposed elemental composition. Finally, MS/MS analyses were performed under HR measurement conditions by using collisional activation (supplementary figure 1C). The product ion spectrum (under normalized collision energy (NCE) = 35% conditions) showed ions at m/z 243.1959 and m/z 59.0139 that is the specific product ion from dissociation of the deprotonated carboxyl group link to a methyl. Thus, with the fragmentation pattern we identified the C14-3OH. Consequently, the extracted ion chromatogram (EIC) of the diagnostic product ion at m/z 59.0139 corresponding to the daughter ion of a 3-hydroxyl fatty acid allowed us to identify the Cn-3OH molecules with Cn ≠ C14.

Supplementary table 1

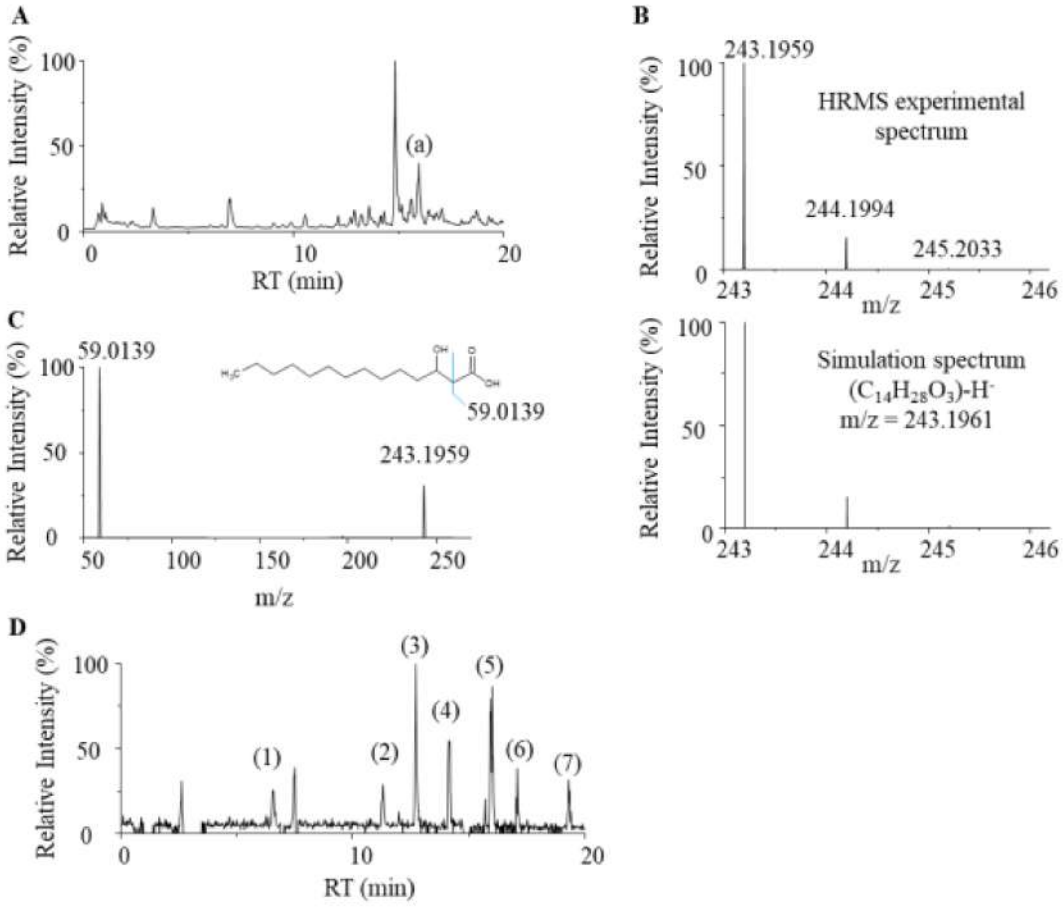
Abbreviation	E. coli strain		Reference
MG1655	MG1655	Serotype OR:K-:H48	Blattner et al;1997 [4]
ECN	Nissle 1917	Serotype O6:K5:H1	Olier et al., 2012 [5]
ECN ΔclbP	Nissle 1917	Serotype O6:K5:H1	Perez-Berezo T et al, 2017 [3]
ECN S95R	Nissle 1917	Serotype O6:K5:H1	Massip et al, 2019 [6]
ECN ΔclbA ΔentD	Nissle 1917	Serotype O6:K5:H1	Massip et al, 2019 [6]
UTI	UTI89	Serotype O18:K1:H7	Mulvey et al., 2001 [7]
Nu14	Nu14	Serotype O18:K1:H7	Johnson et al., 2001 [8]
SP15	SP15	Serotype O18:K1:H7	Johnson et al., 2002 [9]
CFT	CFT073	Serotype O6:K2:H1	Mobley et al., 1990 [10]
NC101	NC101	Serotype O2:H6/41	Kim et al., 2005 [11]
ABU	AB83972	Serotype OR:K5:H-	Lindberg et al., 1975 [12]
M1/5	M1/5	Serotype O75:H5	Secher et al., 2015 [13]

Supplementary table 2

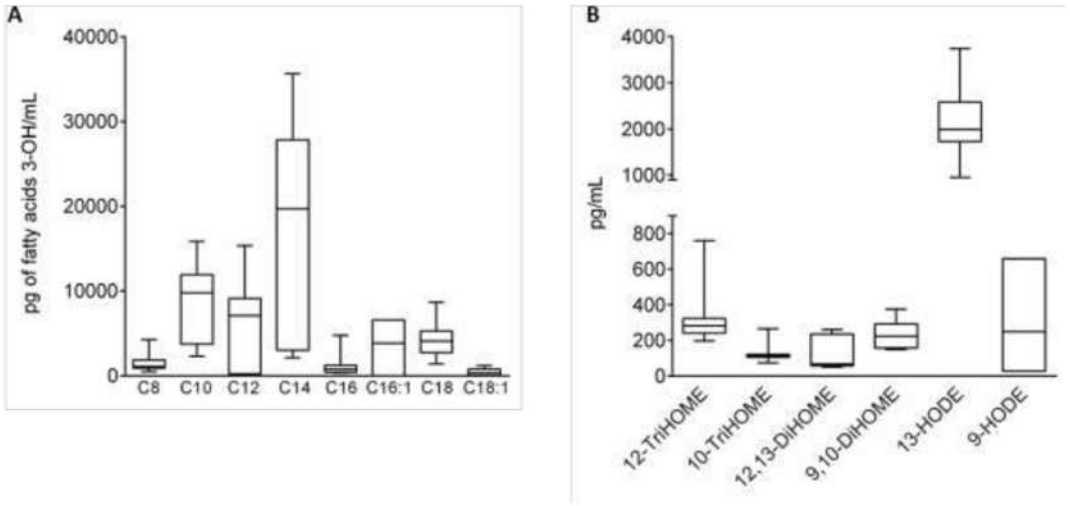
Compound name	RT (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	CE (V)
C8-3OH	1.827	159.1	59.0	90	14
12-TriHOME	3.177	329.2	211.1	90	18
10-TriHOME	3.279	329.2	171.1	100	18
C10-3OH	4.130	187.1	59.0	90	14
C12-3OH	7.080	215.2	59.0	90	14
12,13-DiHOME	7.184	313.2	183.1	85	18
9,10-DiHOME	7.426	313.2	201.1	90	14
9-HOTrE	8.707	293.2	171.1	80	10
13-HOTrE	8.910	293.2	195.1	95	10
13-HODE	9.969	295.2	195.0	135	8
9-HODE	10.026	295.2	171.0	135	8
C14-3OH	10.041	243.2	59.0	90	14
13-oxoODE	10.676	293.2	113.1	80	14
9-oxoODE	10.946	293.2	185.0	100	14
C16:1-3OH	11.092	269.2	59.0	90	14
C16-3OH	12.952	271.2	59.0	90	14
C18:1-3OH	13.736	297.2	59.0	90	14
C18-3OH	14.243	299.3	59.0	90	14

Supplementary table 3

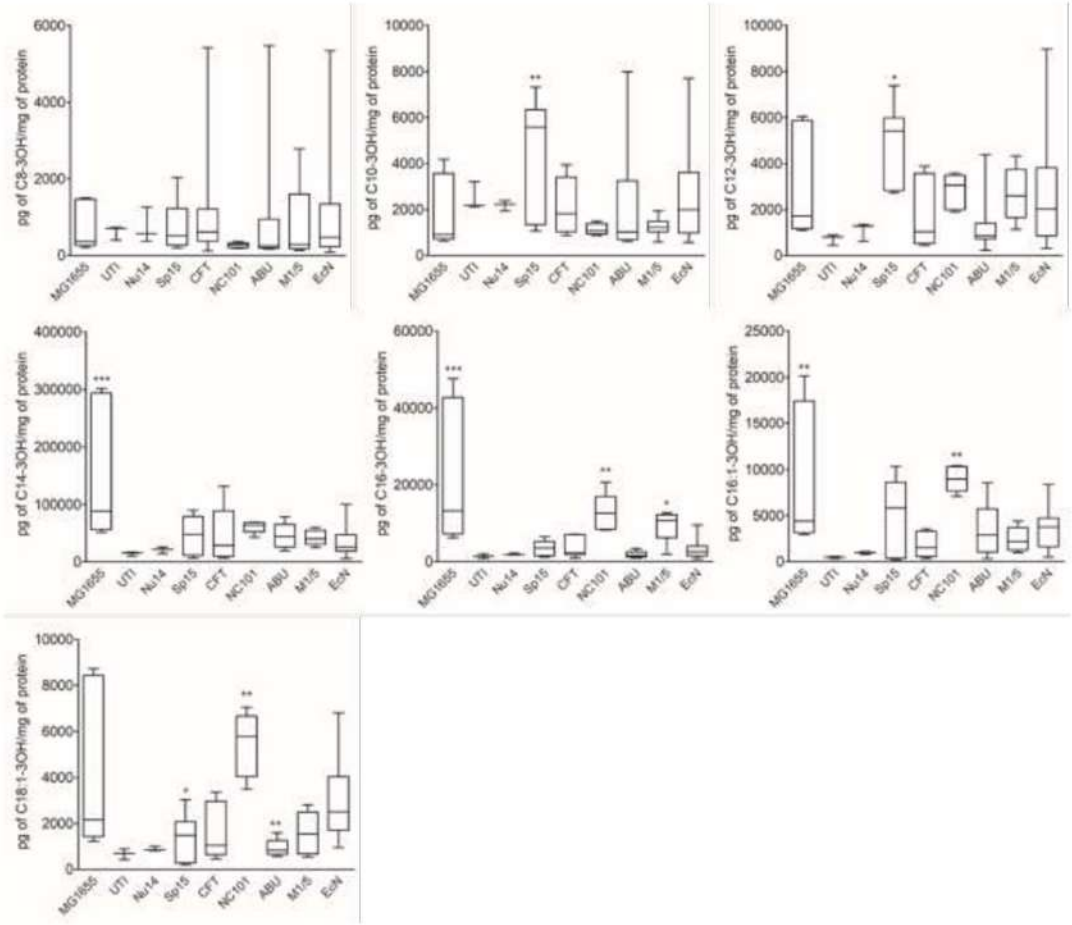
Transcripts	Forward	Reverse
Hprt	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGAT	CCCCGTTGACTGATCATTACAG
Tff3	TGCAGATTACGTTGGCCTGTC	TGGAGTCAAAGCAGCAGCC
Muc2	CGGAACTCCAGAAAGAAGCCA	GGCAGTCAGACGCAAAGTTGTA
Occludine	TGGATGACTACAGAGAGGAGAGT	TCCTCTTGATGTGCGATAATTTGC
Tjp1	AAGTTCCTGAAGCCCGTGGAG	GGAAGACACTTGTTTTGCCAGGT
Reg3γ	CCTCCATGATCAAAAGCAGTGG	GGATTCGTCTCCCAGTTGATGT
Mmp7	ACTGATGGTGAGGACGCAGG	CATCACAGTACCGGGAACAGAA
Tnfα	CCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC	GGTCTGGGCCATAGAACTGATG
Ccl5	ACTCCCTGCTGCTTTGCCTA	TTCCTTCGAGTGACAAACACGA
Tgfβ	GACCCCCACTGATACGCCT	GCTGAATCGAAAGCCCTGTA
Il6	CTCTGCAAGAGACTTCCATCCAGT	CGTGGTTGTCAACAGCATCA
Il1β	ACCTTCCAGGATGAGGACATGAG	CATCCCATGAGTCACAGAGGATG
Nfkb	TGAAGATGTTGCTGGCCGT	GCAGATCCCTCACAAGCTGA
Cxcl1	GCTAAAAGGTGTCCCCAAGTAACG	TCACCAGACAGGTGCCATCA
Cxcl2	AGCCCCCCTGGTTCAGAAA	TCCAGGTCAGTTAGCCTTGCC
Fiaf	CACCCTTCAAAGACTCCGAGG	TGAGCCTTGAGCTGAGTCTGC
Lfabp	TTCAAAGGCATAAAGTCCGTGAC	GCCTTGTCTAAATTCTCTTGCTGA
Cd36	GGCCAAGCTATTGCGACATG	AAAGGTGGAAAGGAGGCTGC



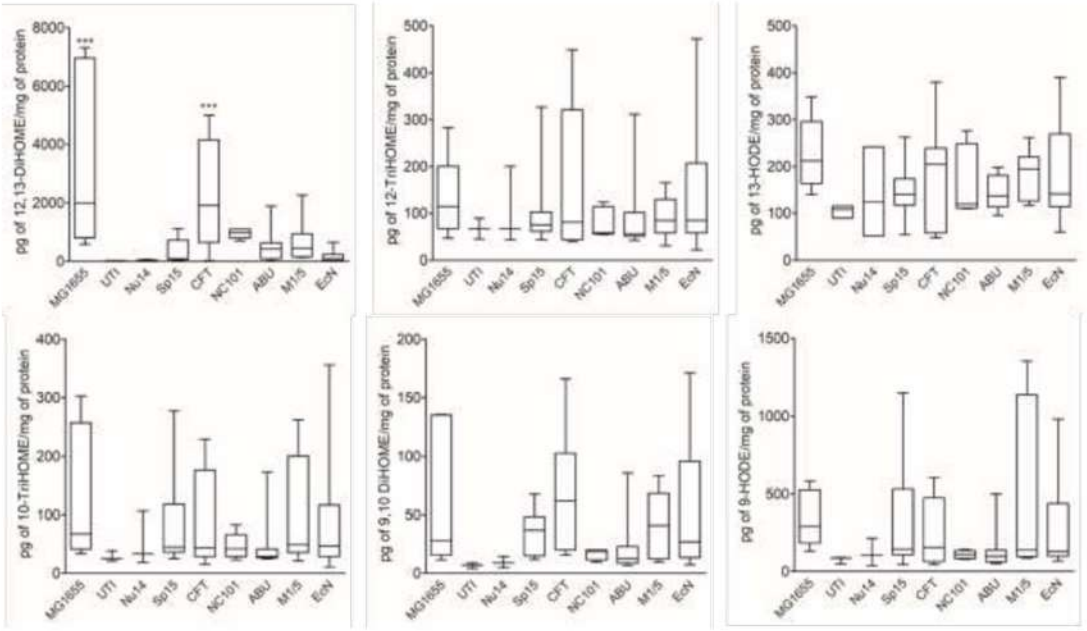
Supplementary figure 1: Identification of LCFA-3OH in bacteria by LC-HRMS. (**A**) Total Ion chromatogram of a lipidic extract of bacteria. (**B**) Natural isotopic distribution of the deprotonated molecule displayed by the high-resolution mass spectrum zoom obtained for the peak eluted at 15.98 min (a) and natural isotopic pattern calculated with the formula $[(C_{18}H_{28}O_3)\text{-}H]^-$. Analogous natural isotopic patterns and similar m/z ratios measured and simulated for the monoisotopic $[(^{12}C_{18}{}^{1}H_{28}{}^{16}O_3)\text{-}H]^-$ ion and for the $[(^{13}C_nC_{18-n}{}^{1}H_{28}{}^{16}O_3)\text{-}H]^-$ (with n = 1 and 2) ions (within an accuracy of 0.8 ppm). (**C**) Product ion spectrum acquired via HCD (NCE = 35%) of the carboxylate anion $[M–H]^-$ (m/z 243) generated in electrospray from the LC peak eluted at 15.98 min. (**D**) Extracted Ion Chromatogram (EIC) of a lipidic extract of bacteria pellet for m/z = 59.0139 corresponding to the daughter ion of a 3-hydroxyl fatty acid. Peak (1) is C10-3OH, peak (2) is C12-3OH, peak (3) is C12:1-3OH, peak (4) is C14:1-3OH, peak (5) is C14-3OH, peak (6) is C16:1-3OH and peak (7) is C16-3OH.



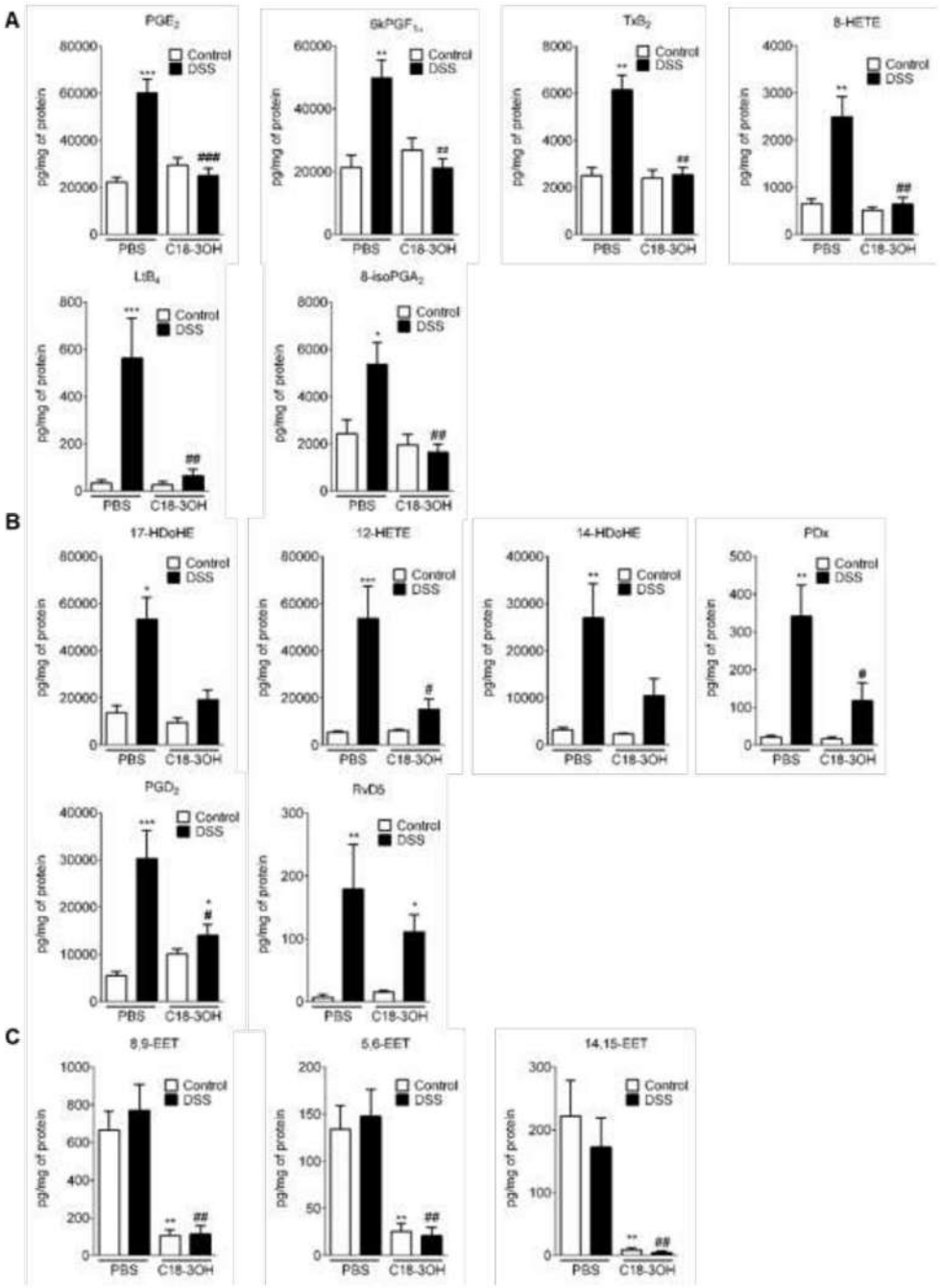
Supplementary figure 2: Quantification of hydroxylated long chain fatty acids by LC-QQQ in EcN culture supernatant. Quantification of long chain fatty acid (LCFA) hydroxylated on the third carbon (**A**) and of metabolites from linoleic acid (C18:2 n-6) (**B**) in EcN culture supernatant. Data are represented as whiskers plot (min to max, centered value at median). N=5 to 10 experiments of three independent bacterial cultures per group.



Supplementary figure 3: Quantification of hydroxylated long chain fatty acids by LC-QQQ. Quantification of long chain fatty acid (LCFA) hydroxylated on the third carbon in pellet of the different strains of *E. coli* by LC-QQQ. Data are represented as whiskers plot (min to max, centered value at median). N=5 to 10 experiments of three independent bacterial cultures per group. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, significantly different from EcN.

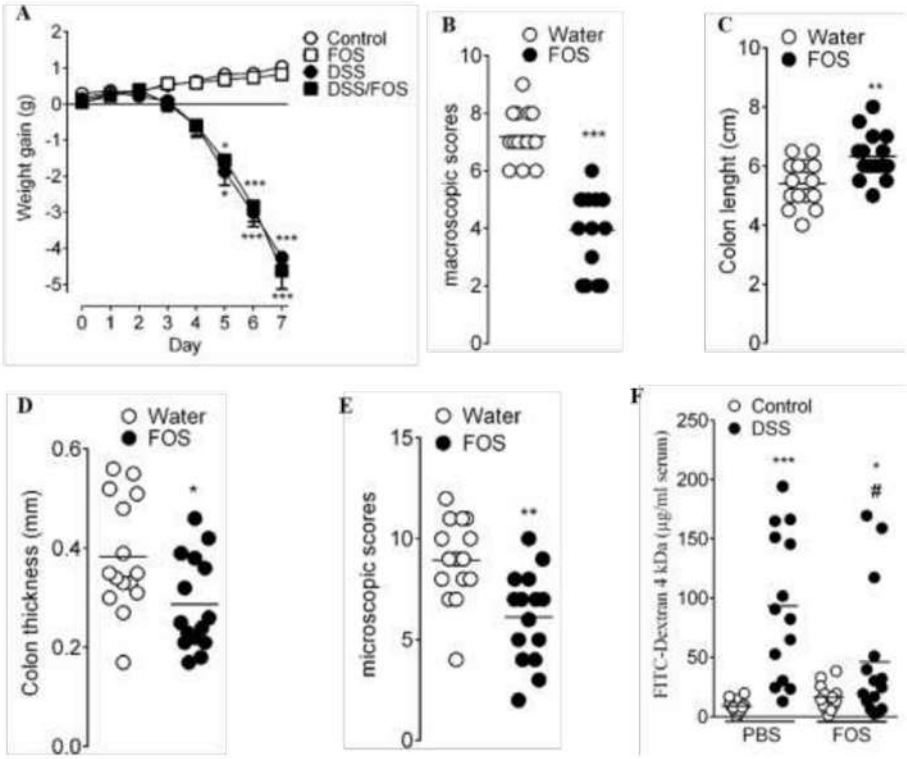


Supplementary figure 4: Quantification of hydroxylated long chain fatty acids by LC-QQQ. Quantification of linoleic acid (C18:2 n-6) metabolites in the different strains of *E. coli* by LC-QQQ. Data are represented as whiskers plot (min to max, centered value at median). N=5 to 10 experiments of three independent bacterial cultures per group. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. ***$p < 0.001$, significantly different from EcN.



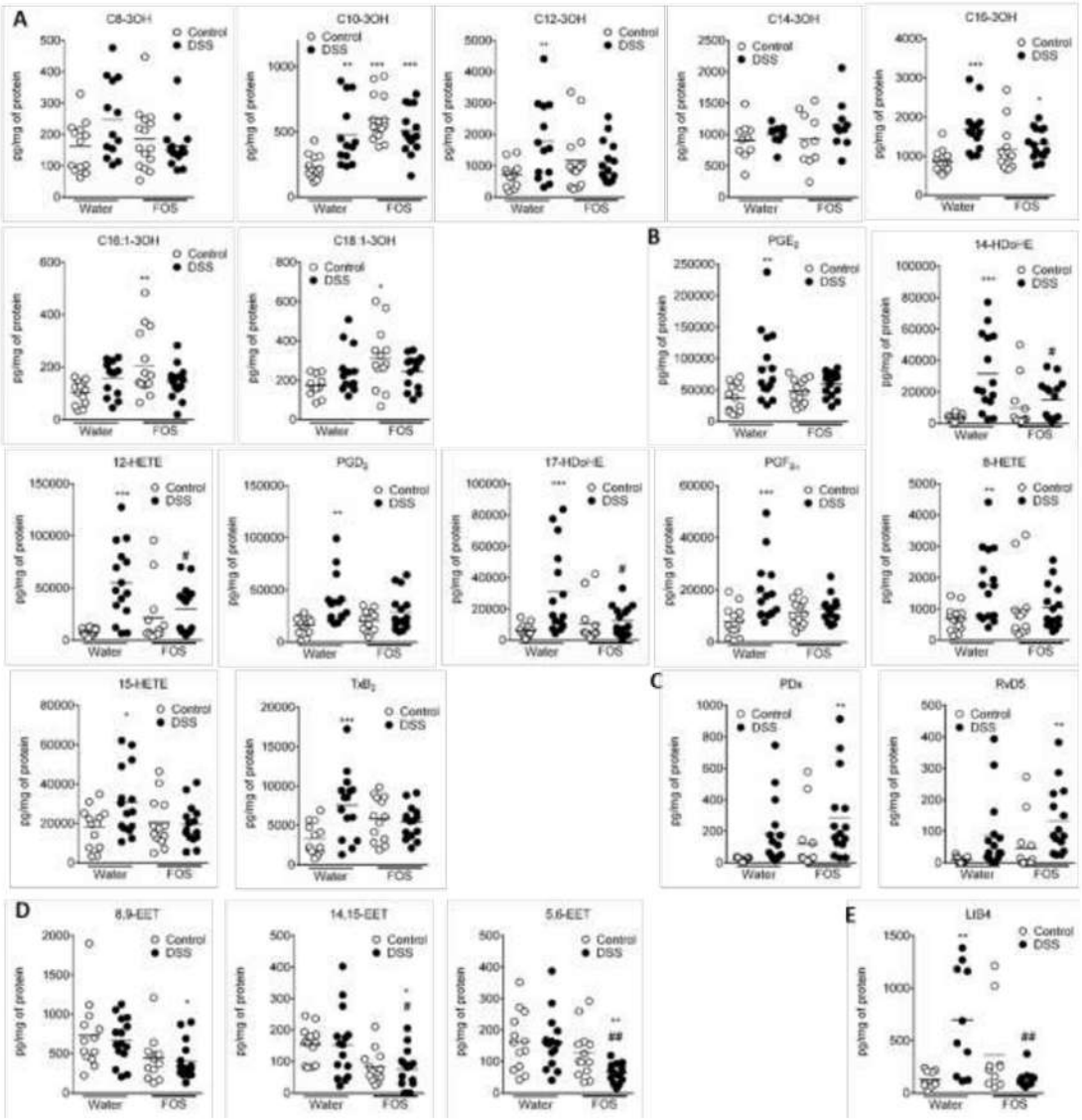
Supplementary figure 5: Concentration of PUFA metabolites in mouse colon. PUFA concentration of cluster 1 (**A**), cluster 2 (**B**), cluster 3 (**C**) in control (white bars) and DSS-treated mice (black bars) gavaged or not with C18-3OH. Data are represented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, significantly different from control. #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 significantly different from DSS/PBS group.

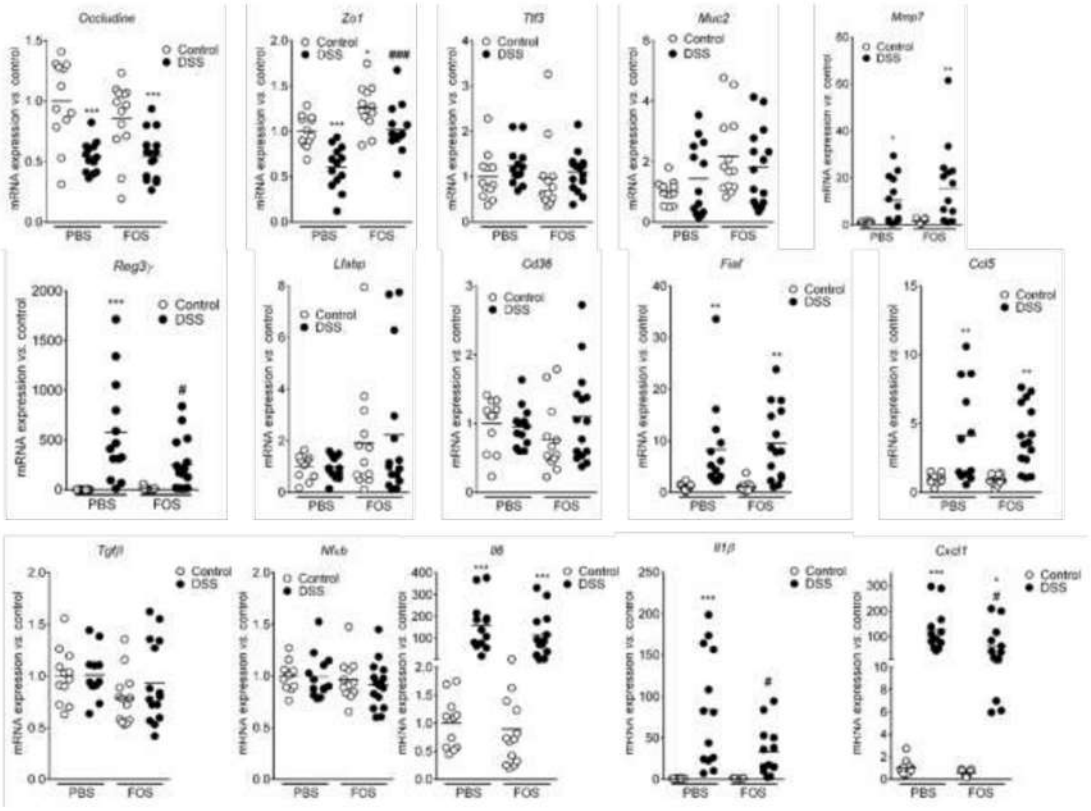


Supplementary figure 6: Fructooligosaccharides diet reduces DSS-induced colitis. (**A**) Weight gain was observed in DSS-treated (black symbols) or control mice (white symbols) treated with FOS (square) or not treated (circle). Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using repeated-measures 2-way ANOVA and a Bonferroni's multiple comparisons post hoc tests. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ significantly different from control group. Colitis severity was assessed by macroscopic damage scores (**B**), colon length (**C**), colon thickness (**D**) and microscopic damage scores (**E**) in DSS/FOS (black symbols) or DSS (white symbols). Data are expressed as mean. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ significantly different from water group. (**F**) Paracellular permeability was quantified in the serum of mice treated with the DSS (black symbols) or their control (white symbols) and treated with FOS (right symbols) or not (left symbols). Data are expressed as mean. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent

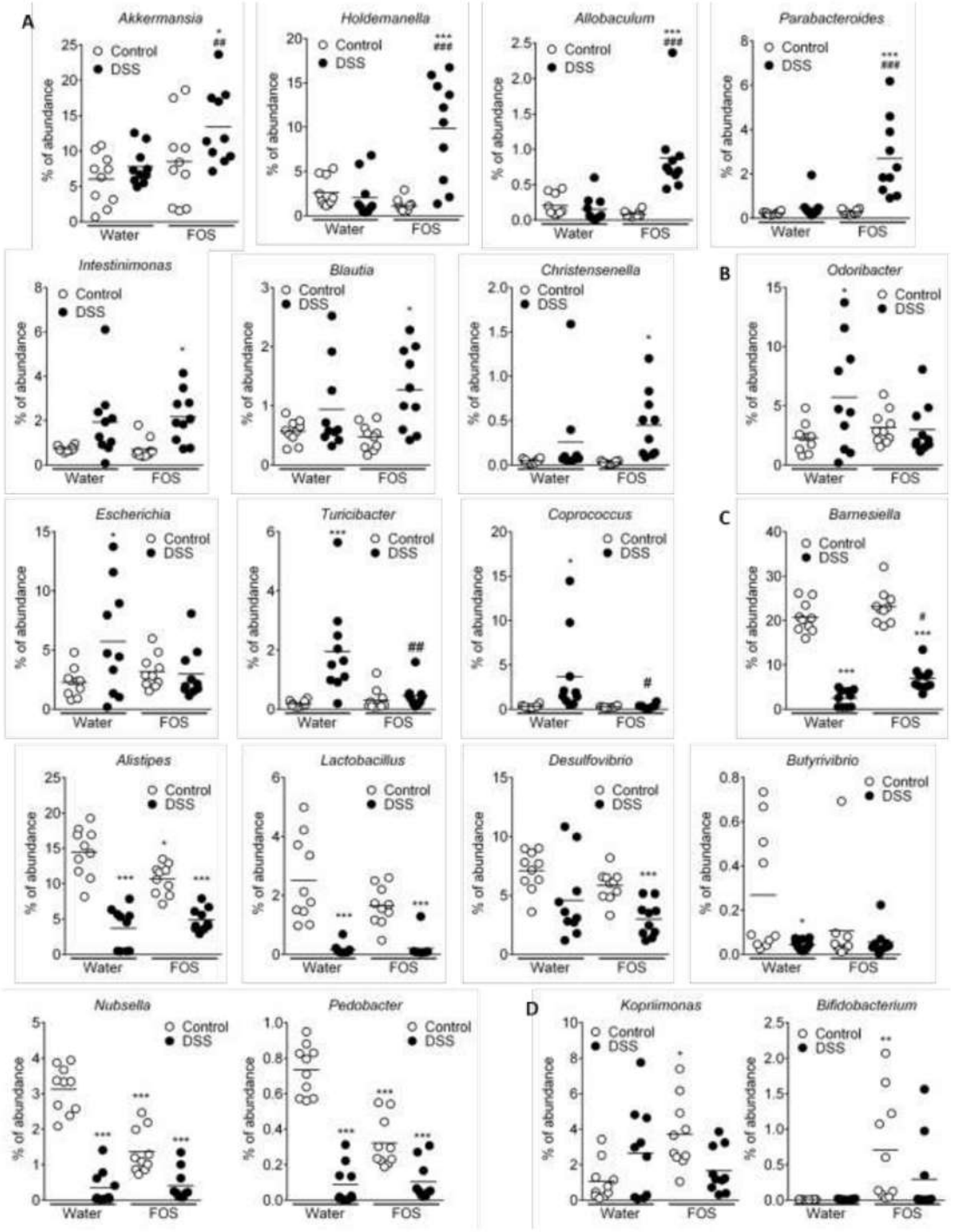
Dunn's post hoc test. *p<0.05, ***p<0.001, significantly different from control/PBS group and #p<0.05, significantly different from DSS/PBS group.



Supplementary figure 7: Concentration of LCFA-3OH and PUFA metabolites in mouse colon. LCFA-3OH (**A**) and PUFA concentration of cluster 1 (**B**), cluster 2 (**C**), cluster 3 (**D**) and cluster 4 (**E**) in control (white symbols) and DSS-treated mice (black symbols) and treated or not with FOS. Data are represented as mean. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, significantly different from control. #$p < 0.05$, ##$p < 0.01$, significantly different from DSS/water group.

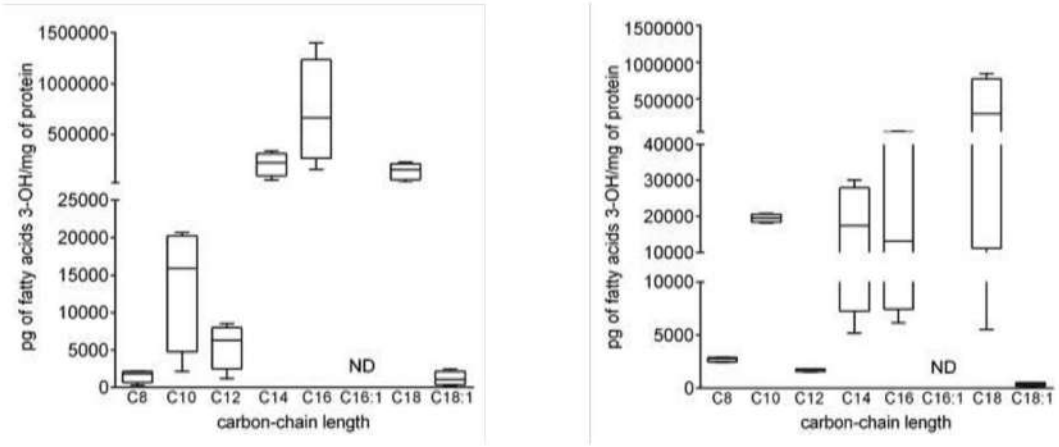


Supplementary figure 8. Fructooligosaccharides diet reduces DSS-induced pro-inflammatory genes. mRNA of several genes were quantified in colon of mice treated with the DSS (black bars) or their control (white bars) and treated with FOS (right bars) or not (water, left bars) by quantitative real-time polymerase chain reaction. mRNA content was normalized to HPRT mRNA and quantified relative to the control/PBS group. Data are expressed as mean. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from control/PBS group and # p<0.05, significantly different from DSS/PBS group.

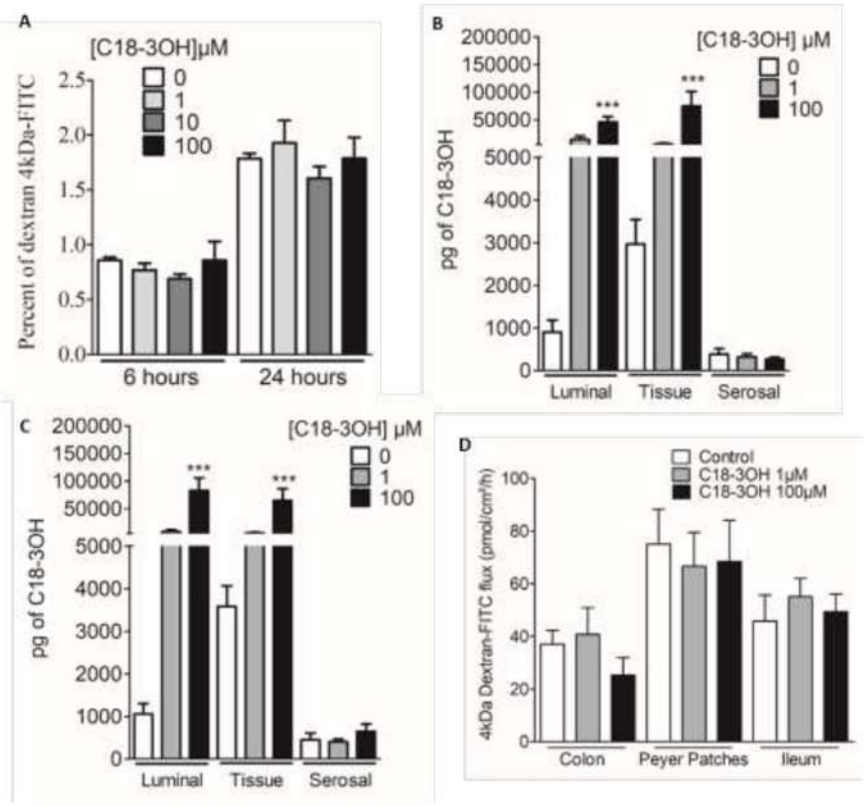


Supplementary figure 9: Percentage of abundance in genera of the first cluster. Abundance in genera of the cluster 1 (**A**), 3 (**B**), 5 (**C**) and 6 (**D**) in the caecum of mice treated with the DSS (black symbols) or their control (white symbols) and treated with FOS (right symbols) or not (left symbols). Data are expressed as mean. Statistical analysis was performed

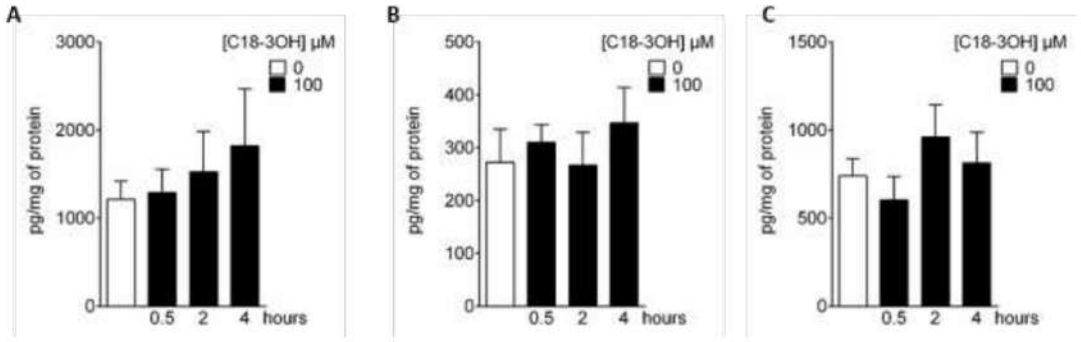
using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. *p<0.05, ***p<0.001 significantly different from control/water group. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 significantly different from control/DSS group.



Supplementary figure 10: Quantification of hydroxylated long chain fatty acids by LC-QQQ in *Holdemanella biformis*. Quantification of long chain fatty acid (LCFA) hydroxylated on the third carbon in pellets (left panel) and in *Holdemanella biformis* culture supernatant. Data are represented as whiskers plot (min to max, centered value at mean). N=1 experiment of four independent bacterial cultures per group.



Supplementary figure 11: C18-3OH does not cross the epithelial barrier and does not modify paracellular permeability. (**A**) Paracellular permeability was determined by the quantification of the FITC fluorescence in basolateral compartment of Caco2 cells cultured in Transwell 6 hours or 24 hours after the treatment by C18-3OH (0 µM white bar, 1 µM light gray bar, 10 µM dark gray bar or 100 µM black bar). One hour after treatment with C18-3OH (0 µM white bar, 1 µM gray bar or 100 µM black bar) at the luminal side of an ileum biopsy (**B**) or Peyer's patches (**C**) mounted in Ussing chamber, C18-3OH was quantified in the luminal and serosal compartment and in the tissue. n=12 to 15 experiments. (**D**) Paracellular permeability was determined by the quantification of the FITC fluorescence in serosal compartment of Ussing chambers mounted with colon, ileum or Peyer's patches 1 hour after the treatment by C18-3OH (0 µM white bar, 1 µM gray bar or 100 µM black bar). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test. ***p<0.001, significantly different from 0 µM of C18-3OH condition.



Supplementary figure 12: Quantification of C18-3OH along the gut and in the blood. Mice were orally treated with C18-3OH (0 µM white bar or 100 µM black bar) every day during 7 days and C18-3OH was quantified 30 minutes, 2 hours and 4 hours after the last gavage in the ileum (**A**), the Peyer's patches (**B**) and the blood (**C**). Data are represented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's post hoc test.

Supplementary references

1 Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I*, et al.* LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2013;**932**:123-33.
2 Everard A, Lazarevic V, Gaia N*, et al.* Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. ISME J 2014;**8**:2116-30.
3 Perez-Berezo T, Pujo J, Martin P*, et al.* Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. Nat Commun 2017;**8**:1314.
4 Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA*, et al.* The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. Science 1997;**277**:1453-62.
5 Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C*, et al.* Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. Gut Microbes 2012;**3**:501-9.
6 Massip C, Branchu P, Bossuet-Greif N*, et al.* Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of Escherichia coli Nissle 1917. PLoS Pathog 2019;**15**:e1008029.
7 Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection. Infect Immun 2001;**69**:4572-9.
8 Johnson JR, Weissman SJ, Stell AL*, et al.* Clonal and pathotypic analysis of archetypal Escherichia coli cystitis isolate NU14. J Infect Dis 2001;**184**:1556-65.
9 Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT*, et al.* Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among Escherichia coli isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. J Infect Dis 2002;**185**:774-84.
10 Mobley HL, Green DM, Trifillis AL*, et al.* Pyelonephritogenic Escherichia coli and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. Infect Immun 1990;**58**:1281-9.
11 Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA*, et al.* Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. Gastroenterology 2005;**128**:891-906.
12 Lindberg U, Claesson I, Hanson LA*, et al.* Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. I. Clinical and laboratory findings. Acta paediatrica Scandinavica 1975;**64**:425-31.
13 Secher T, Payros D, Brehin C*, et al.* Oral tolerance failure upon neonatal gut colonization with Escherichia coli producing the genotoxin colibactin. Infect Immun 2015;**83**:2420-9.

Article 2 : Douleur viscérale induite par le stress prénatal : rôle des lipopeptides bactériens

Résumé :

Les données cliniques suggèrent que des évènements néfastes durant la vie fœtale et la petite enfance augmentent l'incidence du syndrome de l'intestin irritable à l'âge adulte. Le but de notre étude était de comprendre les liens de causalité entre le stress prénatal, le microbiote intestinal et l'hypersensibilité viscérale. Nous avons développé un modèle murin de stress prénatal (SP) et évalué dans la descendance mâle et femelle l'hypersensibilité viscérale à la distension colorectale et l'inflammation du côlon. Pour ce dernier paramètre, nous avons mesuré la perméabilité paracellulaire, scoré l'inflammation macroscopique et microscopique, l'expression de gènes important dans la physiopathologie intestinale et la production de lipides bioactifs. Par séquençage de l'ARN 16S, nous avons caractérisé la composition taxonomique des bactéries du microbiote fécal de ces souris et par FISH de l'ARN 16S, nous avons observé sa biogéographie. Dans les bactéries dont l'abondance était diminuée chez les souris SP, nous avons quantifié par spectrométrie de masse la production de lipopeptides liés à du GABA. Enfin, nous avons évalué les effets de ces molécules sur l'hypersensibilité viscérale des souris SP. Les souris mâles et femelles, stressées pendant la période prénatale, présentaient une hypersensibilité viscérale associée à une absence d'inflammation visible et à une dysbiose du microbiote intestinal. Cette dysbiose était caractérisée par une augmentation de l'abondance de *Clostridium clostridioforme* et une abondance diminuée de *Ligilactobacillus murinus*, indépendamment du sexe. L'abondance de *L. murinus* était inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale et à la distension colorectale des souris. Cette souche bactérienne produisait plusieurs lipopeptides contenant du GABA dont le C14asnGABA. Finalement, un traitement intra-colique avec du C14asnGABA diminuait la sensibilité viscérale des souris SP à la distension colorectale. Le stress prénatal impacte la composition et la capacité fonctionnelle du microbiote intestinal jusqu'à l'âge adulte. La capacité réduite du microbiote intestinal à produire des lipopeptides contenant du GABA pourrait être un des mécanismes liant le stress prénatal et l'hypersensibilité viscérale à l'âge adulte.

Résultats :

1. Le stress prénatal induit de l'hypersensibilité viscérale dans la descendance adulte

Les souris gestantes ont été stressées par de la lumière vive couplée à une contention pendant 30min 3 fois par jour, du 13ème au 18ème jour de gestation. Nous avons évalué l'effet du stress prénatal (SP) sur l'homéostasie intestinale de la descendance adulte **(*Figure 1)***. Nous avons mesuré l'impact du SP sur la sensibilité viscérale à l'âge adulte en quantifiant les réponses viscéro-motrices (RVM) à la distension colorectale des souris. Dans la descendance SP, mâle comme femelle, l'aire sous la courbe (Area under the curve, AUC) de la RVM était augmentée significativement par rapport aux souris contrôles **(*Figure 1A)***. Le SP induit donc une hypersensibilité viscérale dans la descendance adulte. Chez les patients, le SII est caractérisé par une absence d'inflammation macroscopique du côlon. Cette caractéristique était retrouvée dans notre modèle puisque la descendance SP des deux sexes ne présentait pas de modification de la perméabilité paracellulaire, de l'épaisseur du côlon, et des scores inflammatoires macroscopiques et microscopiques **(*Figure 1B & 1C)***. Au niveau moléculaire, le SP a eu peu d'impact sur les concentrations des métabolites d'acide gras poly-insaturés au niveau du côlon. En effet, le regroupement par hiérarchisation a montré une séparation des souris en fonction de leur sexe et non en fonction de leur groupe **(*Figure 1D)***. Seules les concentrations du 8,9-EET, du 11, 12-EET (Acide 11,12-epoxy-eicosatrienoïque), du 14,15-EET (Acide 14,15-epoxy-eicosatrienoïque), du 5-oxoETE (Acide 5-Oxo-eicosatetraenoïque), du 5-HETE, du 8-HETE, de LXA_4 (Lipoxine A4) et du 10-HODE (acide 10-Hydrxyoctadecadienoöique), étaient diminuées significativement chez les mâles SP par rapport aux mâles contrôles ***(Tableau supplémentaire 3)***. Nous avons également quantifié l'expression de gènes codant pour les enzymes principales impliquées dans le métabolisme des AG poly-insaturés, de l'immunité du côlon et de l'homéostasie intestinale. Comme pour les AG poly-insaturés, le groupement par hiérarchisation séparait les souris indépendamment de leur groupe. Seul l'expression de la lipoxygénase 5 (*Alox5)* était augmentée chez les mâles SP **(*Tableau supplémentaire 4)***. Enfin, dans la descendance SP, les pourcentages de lymphocytes TCD8+ et TCD4+ étaient inchangés par rapport aux contrôles, indépendamment de leur statut conventionnel ou mémoire ***(Figure supplémentaire 1)***. En conclusion, nous avons montré que le stress prénatal induit une hypersensibilité viscérale à l'âge adulte sans engendrer d'inflammation intestinale.

2. Le stress prénatal induit une dysbiose du microbiote intestinal et altère son organisation spatiale à l'âge adulte

Les études cliniques s'intéressant au microbiote des patients SII par rapport aux contrôles ont mis en évidence qu'il existe chez ces patients une diminution de la diversité de leur microbiote. Cette diminution pourrait être responsable d'une altération de ses fonctions. L'analyse du microbiote fécal des souris SP par séquençage de l'ARN 16S a mis en évidence une dysbiose du microbiote intestinal chez les mâles comme chez les femelles ***(Figure 2)***. De façon commune aux deux sexes, le microbiote présentait une perte de diversité globale, une augmentation de l'abondance de *Clostridium clostridioforme* et une diminution de celle de *Lactobacillus animalis* ***(Figure 2)***. Au-delà des changements de taxonomie, le SP a induit chez nos souris une altération de l'organisation du microbiote au niveau du côlon ***(Figure 3)***. Chez les souris contrôles, les bactéries du côlon sont séparées de l'épithélium par une couche dense et stérile de mucus. Chez les souris SP, des bactéries, représentées par le marquage en rouge de leur ARN 16S, étaient présentes dans cette couche de mucus **(*Figure 3A)***. En quantifiant le marquage d'ARN 16S dans la couche de mucus et la distance de ce marquage par rapport à la lumière, nous avons mis en évidence que chez les souris SP, il y avait plus de bactéries qui entraient dans le mucus et qu'elles étaient plus proche de l'épithélium ***(Figure 3B)***. Ces expériences montrent que le stress prénatal induit une dysbiose du microbiote intestinal à l'âge adulte.

3. L'abondance de *L. animalis* est inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale

Pour déterminer les facteurs importants dans les différences observées entre les souris SP et les souris contrôles, nous avons réalisé des analyses statistiques multivariées en incluant l'ensemble de données obtenues pour 14 souris par groupe provenant de 3 expériences indépendantes. Pour déterminer l'agrégation et la dispersion des échantillons, nous avons réalisé une analyse par composante principale (APC) ***(Figure 4A)***. Nous avons ensuite modélisé la classification des échantillons par PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis) et OPLS-DA (Orthogonal PLS-DA) ***(Figure 4B & 4C)***. Ces trois modèles mathématiques ont montré que les

souris contrôles et les souris stressées sont séparés par les variables que nous avons inclues. 11 variables avaient une p-value ≤0,05 et un score VIP (variable importance in projection) ≥ 1, elles ont donc une importance majeure dans la séparation des deux groupes de souris. Parmi ces variables nous avons retrouvé 8 espèces bactériennes (*Clostridia unclassified, Paraeggerthella hongkongensis, Lactobacillus animalis, Clostridium clostridioforme, Clostridium colinum, Clostridiales unknown, Betaproteobacteria unknown, et Bacteria unclassified),* et l'AUC de la réponse viscéro-motrice à la distension colorectale ***(Figure 4D)***. Une analyse par corrélation de Spearman a renforcé le lien entre les bactéries identifiées et la douleur viscérale. En effet, leur abondance était inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale des souris, la corrélation la plus forte étant retrouvée avec *L. animalis* **(*Figure 4E)***. En conclusion, l'hypersensibilité viscérale et la composition du microbiote étaient les deux facteurs les plus importants dans la séparation des souris contrôles et SP et l'abondance de *L. animalis* était inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale.

4. La concentration de *L. murinus* dans les fèces est diminuée chez les souris SP à l'âge adulte

Par MALDI-TOF, nous avons identifié la présence de *L. murinus* dans des cultures de côlons de souris contrôle et SP. En 2020, le genre *Lactobacillus* contenait 261 espèces, très différentes les unes des autres de par leur caractéristiques phénotypiques, écologiques et génotypiques. Zheng *et al.* [178] ont réévalué la taxonomie des *Lactobacillus* et les ont divisés en 25 nouveaux genres. Dans cette nouvelle classification, *Lactobacillus animalis* est maintenant classifié en tant que *Ligilactobacillus animalis*. Cette espèce est très proche de *Ligilactobacillus murinus* et il est difficile de les différencier par séquençage de l'ARN 16S ou par des sondes spécifiques. C'est pourquoi, il est recommandé de les identifiées comme une seule et même espèce, *L. murinus/animalis.* Comme cette espèce était celle qui possédait la meilleure corrélation avec l'hypersensibilité viscérale, nous avons focalisé notre attention sur le rôle de cette bactérie dans l'homéostasie intestinale. Nous avons séquencé l'ADN de la souche identifiée dans nos souris et confirmé que cette bactérie est bien de l'espèce *murinus* et qu'elle diffère légèrement de la souche de référence *L. animalis* DSMZ-20602. Cette souche sera nommée *L. murinus* IRSD_2020 dans la suite des résultats. Nous avons quantifié la présence de cette souche dans les fèces de souris contrôles et SP par PCR Taqman. La quantité de *L. murinus* IRSD_2020 était inférieure dans

les souris issues de mères stressées par rapport aux souris contrôles et cette quantité était inversement corrélée à l'AUC de la réponse à la distension colorectale **(*Figure 5B)***. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des sondes conçues pour cibler la souche de référence.

5. *L. murinus* produit un lipopeptide analgésique

Comme l'abondance de *L. murinus* IRSD_2020 était inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale des souris, nous avons émis l'hypothèse que cette souche bactérienne produit un métabolite analgésique. En 2017, l'équipe a montré qu'*E. coli Nissle 1917* produit un lipopeptide analgésique lié au GABA, le C12AsnGABA [207]. Nous avons donc identifié et quantifié les lipopeptides contenant du GABA dans les culots de *L. murinus* IRSD_2020. Comme cette souche ne possède pas les enzymes nécessaires à la production de GABA, nous avons supplémenté le milieu de culture avec 8g/L de GABA. *L. murinus* IRSD_2020, en présence de GABA, produit plusieurs lipopeptides contenant du GABA : du C16PheGABA, du C12asnGABA, du C16GluGABA, du C14asnGABA, C12IleGABA, C14IleGABA, et du C12AlaGABA **(*Figure 6A)***. La concentration totale des lipopeptides-GABA et la concentration du C12AsnGABA, C16GluGABA, C14AsnGABA, C14IleGABA et C12AlaGABA étaient significativement augmentées dans les bactéries cultivées en présence de GABA **(Figure 6A)**. Dans les côlons des souris SP, la concentration totale de lipopeptides-GABA et la concentration de C14asnGABA et C12AsnGABA était diminuée significativement par rapport aux côlons des souris contrôles **(*Figure 6B)***. Enfin, nous avons mesuré la RVM à la distension colorectale de souris SP prétraitées, 30min avant, en intra colique par le C14asnGABA (10µM) ou son solvant. Ce traitement a entraîné une diminution de l'hypersensibilité viscérale chez les souris SP ***(Figure 6C)***. En conclusion, nous avons identifié que *L. murinus* IRSD_2020 produit des lipopeptides liés au GABA. Un traitement avec du C14asnGABA, diminué dans les colons des souris SP, restaure une normo-sensibilité chez ces souris.

Conclusion :

L'incidence du SII à l'âge adulte est associée avec une plus grande survenue d'évènements néfastes pendant la période utérine et la petite enfance [370]. Cependant, les biais de mémoire et la difficulté de suivre les personnes sur plusieurs années compliquent la réalisation d'études cliniques établissant des liens de causalité entre le stress gestationnel et l'apparition de troubles fonctionnels digestifs dans la descendance adulte. Dans cette étude, grâce à un modèle murin de stress prénatal, nous avons montré que la descendance, mâle et femelle, présente les caractéristiques du SII : une hypersensibilité viscérale, une absence d'inflammation visible et une dysbiose du microbiote intestinal. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés chez le rat où le stress prénatal entraînait une augmentation de la sensibilité viscérale sans changement de la perméabilité intestinale. Contrairement au stress chronique à l'âge adulte qui entraîne une augmentation des taux de corticostérone plasmatique [300], le stress prénatal n'entraînait aucune variation du taux basal de corticostérone chez les souris adultes comme décrit précédemment dans ce modèle [311], [343], [345].

La dysbiose du microbiote intestinal était caractérisée par une augmentation de *Clostridium clostridioforme* et une diminution de *L. murinus* et *L. animalis* de façon similaire dans les deux sexes*. Clostridium clostridioforme* a été reclassifiée en 2019 [371] et est maintenant référencée sous le nom de *Enterocloster clostridioformis.* Elle est très proche génétiquement de deux autres espèces *C. boltae* et *C. hathewayi*, et sont considérées comme un seul et même groupe [372]. Ces 3 bactéries sont retrouvées dans les fèces humains et ont été associées à l'incidence des troubles du spectre autistique (TSA) chez l'enfant [372]–[374]. Chez le rongeur, le SP a été associé à une augmentation des TSA mais dans ces études, le microbiote intestinal n'a pas été étudié [375]–[377]. Ainsi, les liens de causalité entre le SP, *Clostridium clostridioforme* et les TSA n'ont pas été établis avec certitude. Des études seront nécessaires pour établir s'il existe un lien entre *Clostridium clostridioforme* et le SII. Comme un lien a déjà été établi entre cette bactérie et des modifications comportementales, elle pourrait également être impliquée dans la survenue de l'anxiété et de la dépression, les comorbidités psychiatriques principales du SII. La diminution de l'abondance de *Lactobacillus* semble être une réponse universelle au stress chronique. En effet, cette observation a déjà été faite dans divers modèles de stress chroniques subis à différents moments de la vie et dans des espèces différentes [295], [298], [354]. Chez l'humain, les études s'intéressant au lien entre le stress perçu par la mère pendant la grossesse et le microbiote du

nouveau-né ont également observé une diminution de l'abondance de *Lactobacillus* dans leur fèces [342]. Il reste encore à établir si chez l'homme, comme chez le rongeur, cette diminution persiste jusqu'à l'âge adulte. Comme l'abondance de *L. murinus* était inversement corrélée à la sensibilité viscérale des souris, nous avons émis l'hypothèse que cette espèce produit des molécules aux effets analgésiques. Dans une étude précédente, l'équipe avait identifié un lipopeptide contenant du GABA ayant des propriétés analgésiques dans la douleur viscérale : le C12asnGABA [207]. La synthèse de cette molécule était dépendante de trois enzymes de l'îlot pks : une phosphopantetheinyl transferase, une NRPS et une enzyme hybride NRPS/PKS. L'addition du C12asn permettait au GABA de traverser la barrière épithéliale intestinale pour agir au niveau des neurones sensitifs, ce que le GABA seul ne pouvait pas faire. *L. murinus IRSD_2020* cultivé en présence de GABA produisait des lipopeptides contenant du GABA : le C16PheGABA, le C12AsnGABA, le C16GluGABA, le C14AsnGABA, le C12IleGABA, le C14IleGABA et le C12AlaGABA. Ces résultats montrent la redondance fonctionnelle du microbiote dans la production de lipopeptides-GABA.

La production de GABA est conservée à travers les différents règnes du vivant. Chez les bactéries, les productrices de GABA les plus étudiées sont des bactéries productrices d'acide lactique comme L. brevis, *L. casei*, *L. paracasei, L. rhamnosus*, and *L. delbrueckii* [378], [379]. Le GABA est synthétisé par une glutamate décarboxylase (GADB) à partir du glutamate importé par une antiport glutamate/GABA (GADC). *L. murinus IRSD_2020* ne possède pas les enzymes nécessaires à la conversion du glutamate en GABA [380]. En revanche, en présence d'un apport exogène de GABA, *L. murinus* IRSD_2020 est capable de l'intégrer à des molécules pour former des lipopeptides. *In vivo*, cet apport de GABA pourrait être fait par deux autres *Lactobacillus L. reuteri* et le cluster *L. taiwanensis/johnsonii/gasseri* (ces espèces sont également difficilement différenciables les unes des autres). Ces deux espèces ont tendance à former des biofilms bi-espèces dans l'intestin et sont régulièrement retrouvées groupées avec *L. murinus* [381]. *L. reuteri* possède les enzymes de conversion du glutamate en GABA [382], et les interactions privilégiées entre ces espèces pourraient représenter un des mécanismes d'acquisition de GABA exogène par *L. murinus.* La production de GABA et de lipopeptides GABA n'est pas restreinte à une seule espèce bactérienne et semble dépendre de mécanismes de coopération bactérienne, ce qui ouvre la possibilité que d'autres espèces interviennent dans ces mécanismes.

Au niveau du côlon, la concentration de C12AsnGABA et de C14AsnGABA était diminuée chez la descendance SP, montrant qu'en plus des changements taxonomiques, le SP a induit une modification métabolique du microbiote. Pour évaluer le rôle du C14asnGABA dans la sensibilité viscérale, nous avons administré ce lipopeptide en intra-colique au souris SP avant distension colorectale. Cette expérience à montrer l'effet analgésique du C14asnGABA. Des analogues du GABA comme la gabapentine ou la prégabaline ont déjà été testées en clinique dans le traitement de l'hypersensibilité viscérale des patients SII. En revanche la balance entre leurs effets bénéfiques (diminution de l'hypersensibilité viscérale) et leurs effets secondaires indésirables (hépatotoxicité et neurotoxicitié) leurs étaient défavorables. Ces molécules ne sont plus conseillées pour ces patients. L'utilisation de probiotiques ou de postbiotiques pourrait potentiellement permettre de conserver les effets bénéfiques sans engendrer d'effets secondaires graves. Enfin, nos résultats montrent que la production de lipopeptides-GABA par les bactéries commensales de l'intestin est l'un des nombreux moyens de communication entre l'hôte et le microbiote. Des études plus approfondies de l'utilisation de bactéries produisant ces molécules ou de nourriture enrichie en GABA pour augmenter la production de lipopeptides-GABA par le microbiote pourraient ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le SII **(*Figure 67)***.

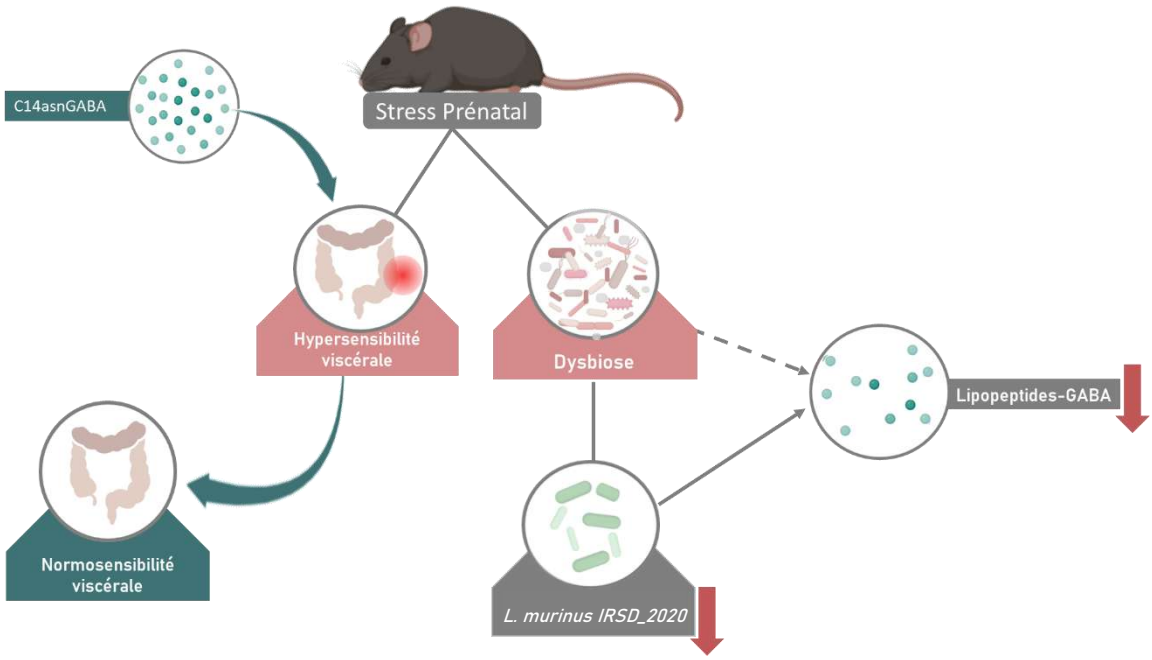


Figure 67 : Schéma bilan du second papier

Identification of bacterial lipopeptides as key players in prenatal stress-induced visceral pain

Camille Petitfils[1]*, Sarah Maurel[1]*, Gaëlle Payros[1], Amandine Hueber[2,3], Bahija Agaiz[1], Geraldine Gazzo[4], Rémi Marrocco[5], Frédéric Auvray[1], Geoffrey Langevin[6], Jean-Paul Motta[1], Pauline Floch[1,7], Marie Tremblay-Franco[8,9], Jean-Marie Galano[6], Alexandre Guy[6], Thierry Durand[6], Simon Lachambre[5], Justine Bertrand Michel[2,3], Abdelhadi Saoudi[5], Eric Oswald[1,7], Pierrick Poisbeau[4], Gilles Dietrich[1], Matteo Serino[1], Pauline le Faouder[2,3#], Nicolas Cenac[1#].

[1] IRSD, Université de Toulouse-Paul Sabatier, INSERM, INRAe, ENVT, UPS, Toulouse, France

[2] MetaboHUB-MetaToul, National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics, Toulouse, France

[3] I2MC, Université de Toulouse, Inserm, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France.

[4] Centre National de la Recherche Scientifique, Institute for Cellular and Integrative Neuroscience (INCI), University of Strasbourg, Strasbourg, France.

[5] INFINITY, Université de Toulouse-Paul Sabatier, INSERM, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France

[6] Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Montpellier, France

[7] CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-hygiène, Toulouse, France

[8] Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Toulouse University, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, F-31027 Toulouse, France.

[9] Metatoul-AXIOM Platform, MetaboHUB, Toxalim, INRAE, F-31027 Toulouse, France.

* Joint first author

Joint last author

Contact info

Nicolas Cenac
INSERM IRSD U1220
CHU Purpan
Place du docteur BAYLAC ; CS 60039
31024 Toulouse Cedex 3; France
Phone: +33 531 547 917
E-mail: nicolas.cenac@inserm.fr

Summary

Objectives: Clinical studies revealed that early life adverse events contribute to the development of irritable bowel syndrome (IBS) in adulthood. The aim of our study was to investigate the relationship between prenatal stress, gut microbiota and visceral hypersensitivity with a focus on bacterial lipopeptides containing GABA that exhibit analgesic activity.

Design: We developed a model of prenatal stress (PS) in mice and evaluated, in adult male and female offspring, visceral hypersensitivity to colorectal distension, paracellular permeability, mRNA expression of genes implicated in inflammation and barrier function, intestinal bioactive lipids and both the composition and biogeography of gut microbiota. Finally, we quantified the production of lipopeptides containing GABA by mass spectrometry in a specific strain of bacteria decreased in PS and assessed their effect on PS-induced visceral hypersensitivity.

Results: Prenatally stressed mice of both sexes presented visceral hypersensitivity, no overt colon inflammation or barrier dysfunction but a gut microbiota dysbiosis. The dysbiosis was distinguished by increased *Clostridium clostridioforme* abundance and a decreased abundance of *Ligilactobacillus murinus* in both sexes. The abundance of *Ligilactobacillus murinus* was inversely correlated with visceral hypersensitivity to colorectal distension in mice. An isolate from this bacterial species produced several lipopeptides containing GABA including C14AsnGABA. Interestingly, intra-colonic treatment with C14AsnGABA decreased the visceral sensitivity of PS mice to colorectal distension.

Conclusion: Prenatal stress impacts the gut microbiota composition and metabolic function in adulthood. The reduced capacity of the gut microbiota to produce GABA lipopeptides could be one of the mechanisms linking prenatal stress and hypersensitivity in adulthood.

Significance of this study

What is already known on this subject?

- 73% of IBS patients have intestinal microbiota dysbiosis
- Perinatal stress is a major risk for the development of IBS in adulthood
- A bacterial lipopeptide, C12AsnGABA, possesses analgesic properties against capsaicin-induced visceral hypersensitivity in mice

What are the new findings?

- In mice, prenatal stress at the end of the gestation induced IBS-like symptoms in adulthood
- Abundance of *Ligilactobacillus murinus* is inversely correlated to visceral sensitivity to colorectal distension
- *Ligilactobacillus murinus* produce several lipopeptides containing GABA whose concentration is decreased in prenatally stressed mice

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Treatment of IBS patients with lipopeptides containing GABA could be used to decrease visceral pain
- Quantification of lipopeptides containing GABA could be used to develop personal therapy
- Lipopeptide-producing bacteria cultured with GABA could represent a novel therapeutic approach in IBS

Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS) affects about 11% of the world population and is one of the most common causes of gastroenterology consultation [1]. This functional intestinal disorder is characterized by repeated periods of abdominal pain and transit changes (constipation, diarrhea, or an alternate of both). IBS symptoms substantially impact the patient's life at the personal, professional, social and economic levels, reducing their quality of life to that of diabetic patients [2]. The etiology of IBS is not fully understood but visceral hypersensitivity has been described in 35-60 % of patients [3] and gut microbiota dysbiosis in 73% of them [4], in absence of colonic macroscopic damage [1]. As no IBS biomarkers have been identified, patients are often confronted with years of medical wandering and absence of treatment [1].

IBS comorbidities include migraines or overactive bladder but also psychiatric diseases such as depression and anxiety [5]. Risk factors for IBS encompass infection, female sex and stress. Indeed, stressful events deeply impact body functions and have been linked to increased severity of IBS symptoms [6]–[8]. Stress can have long-lasting effects on the body's main systems (immune, neural, cardiovascular, endocrine…) [9]. Recent literature has shown that early-life adverse events have consequences on the onset of chronic non-communicable diseases in adulthood such as IBS [10]–[12].

In 2012, Bradford et al. showed that IBS patients reported more early-life stressors than healthy subjects, linking early-life adverse events and IBS onset in adulthood [13]. Because events occurring before birth can hardly be included in questionnaires, the effects of *in utero* events on intestinal dysfunction and IBS symptoms remain unexplored. In murine models, stress in pregnancy results in gut microbiota dysbiosis in mother and offspring [14]. Prenatal stress also induces anxiety and depression in mice offspring, two comorbidities of IBS [15]. The causal link between prenatal stress, gut microbiota dysbiosis and IBS onset in adulthood, however, is not established yet. Here, we hypothesized that visceral hypersensitivity in adulthood may originate from intestinal microbiota dysbiosis induced by stress in pregnancy.

Using a prenatal stress (PS) murine model, we show that PS leads in adulthood to visceral hypersensitivity associated with gut microbiota dysbiosis characterized by a loss of *Ligilactobacillus murinus* IRSD_2020, a novel bacterium serotype producing lipopeptides containing GABA. Among GABA-containing lipopeptides, C14AsnGABA was decreased in the

gut of PS mice. Finally, we showed that this bacterial lipopeptide displays analgesic properties in adult PS mice.

Methods

Animal experiments

Six to ten-week-old C57BL/6J mice (Janvier, Saint Quentin Fallavier, France) were used. All procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the European Council and were approved by the Animal Care and Ethics Committee of US006/CREFE (CEEA-122; application number APAFIS #16385- CE2018080222083660V3). Mice were raised in sanitary conditions without pathogens, with free access to water and food, and submitted to alternating cycles of 12 hours of light and darkness. C57BL/6J dams were randomly assigned to receive stress from day 13 to day 18 of gestation. The pregnant mice assigned to the stress group experienced bright light (100 watts) coupled to restraint for 30 minutes, 3 times a day, with at least 3 hours between each stress session. On the last day, gestating mice were put in separated cages. The pups were weighed every three days to monitor their growth. On postnatal day 21 to 28, the pups were weaned from their mothers. The offspring between 8 and 11 weeks of age, both male and female, were assessed for visceral sensitivity to colorectal distension, paracellular permeability, colon inflammation, plasma corticosterone concentration, colonic concentration of GABA-containing lipopeptides and taxonomic, predicted functional analysis and biogeography of the gut microbiota (Supplementary methods). In a second set of experiments, visceral sensitivity to colorectal distension was assessed in PS mice before and 30 min after intracolonic administration of C14AsnGABA (10 µM).

Identification of colonic mouse bacteria

Ligilactobacillus murinus strain IRSD_2020, *Limosilactobacillus reuteri* and *Lactobacillus johnsonii/gasseri* were isolated from mouse intestinal mucosa on *Lactobacillus* selection agar (BD Diagnostic, Le Pont de Claix, France), and identified by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (Microflex LT MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Germany). Whole genome sequencing of *Ligilactobacillus murinus* strain IRSD_2020 has been performed as well as the quantification of this strain and of *Ligilactobacillus animalis* by Taqman® real-time PCR (Supplementary methods).

Ligilactobacillus murinus strain IRSD_2020 was cultured and GABA-containing lipopeptides quantified (supplementary methods).

Statistical analysis

To perform a multivariate analysis of our cohort, the data obtained from 56 mice (4 groups with 14/group) from 3 different experiments were used to create a matrix including different variables: gene expression, PUFA quantification, VMR to colorectal distension, faecal bacteria abundance from the 16S RNA sequencing, and colon thickness. Principal Component Analysis (PCA) were performed to detect outliers and intrinsic clusters. Then O-PLS-DA was applied to study the relationship between prenatal stress exposure and variables described above. From this analysis, discriminant variables (with a value of Variance Importance in the Projection, VIP, > 1.0) were selected. Wilcoxon test with FDR correction was applied on selected variables. PCA, OPLS-DA and Wilcoxon test were done using the Galaxy Workflow 4 metabolomics (W4m) instance [16], [17]. Correlations were performed by Spearman test.

Data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Due to the small sample size and scoring, comparisons between groups were mainly performed by Mann-Whitney non-parametric test. Multiple comparisons within groups were performed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test. Parametric two-way Anova was used when data were linearly distributed and followed by Bonferroni posthoc test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Prenatal stress induces visceral hypersensitivity in the adult offspring

Gestating 8-10-week-old mice were stressed using bright light coupled to restraint 3 times a day for 30 minutes, from day 13 to day 18 of gestation. We then assessed the effects of prenatal stress (PS) on the 8-11-week-old adult offspring intestinal homeostasis **(Figure 1).** PS altered neither basal plasma corticosterone nor the expression of corticosterone receptors in the colon of the adult offspring **(Figure S2A).** We measured the impact of PS on visceral sensitivity in adulthood by measuring visceromotor responses (VMR) to colorectal distension (CRD). In PS male and female offspring, the AUC of the VMR was significantly increased compared to control mice (**Figure 1A**). No significant differences in visceral paracellular

permeability (**Figure 1B**), colon thickness **(Figure 1C)** and inflammatory scores at the macroscopic and microscopic level **(Figure 1C)** were observed in both males and females offspring from stressed dams as compared to controls**.**

At the molecular level, polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites were quantified in the mouse colons using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). Mice hierarchical clustering showed that the mice were not separated by their stress status but by their sex **(Figure 1D)** demonstrating that PS had little or no impact on colonic PUFA metabolism. PUFA metabolites hierarchical clustering revealed three different clusters **(Figure 1D)**. The first one regrouped products derived from the metabolism of PUFAs by cyclooxygenases (COX) (PGE_2, TXB_2, 6k-$PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, PGD_2, 8-isoPGA_2, 15-dPGJ_2 and PGE_3), by lipoxygenases (LOX) (15-HETE, 12-HETE, 9-HODE, 13-HODE, PDx, and 14-HDoHE) and by cytochromes epoxygenases (11,12-EET). The means of these metabolites' concentrations were higher in females than in males, but no statistical differences were observed between PS and control mice, except for the 11,12-EET, which was significantly decreased in PS male vs Ctrl **(Table S4)**. The second cluster was composed of LOX metabolites (13-oxoODE, 9-oxoODE, 9-HOTrE, LTB4, LXA4, 5-HETE, 5-oxoETE, 8-HETE, and 18-HEPA), CYP metabolites (8,9-EET, 9,10-DiHOME, 14,15-EET, 5,6-EET, 12,13-DiHOME) and by the 10-HODE. In this cluster, the concentration of 5-oxoETE, 5-HETE, 8-HETE, LXA4, 10-HODE, 8,9-EET and 14-15-EET was significantly decreased in PS male offspring compared to control mice **(Table S4)**. Other PUFA metabolites from the LOX pathway (10-TriHOME, 12-TriHOME, LTB5, LXB4, and 13-HOTrE) were portrayed in the last cluster and their mean concentrations were increased in males compared with females, but no statistical differences were observed **(Table S4)**. In addition, we quantified mRNA expression of genes coding for the main enzymes implicated in PUFA metabolism. Heatmap of the expression of PUFA metabolizing enzymes showed a hierarchical separation of the control males from the three other experimental groups. 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase expression clustered apart form 12-lipoxygenase, Cox-1 and Cox-2 mRNA expression. Only *Alox5* which codes for the 5-lipoxygenase was increased in PS males compared to control **(Table S5)**. PS increases neither pro-inflammatory lipid mediators nor the enzymes implicated in their synthesis, with the exception of the 5-lipoxygenase, in adult male mice.

In a second set of experiments, we assessed the mRNA expression of genes implicated in colonic immune response and intestinal homeostasis **(Figure 1E)**. Again, hierarchical clustering

showed that mice were not separated by their stress status but by their sex and that genes were clustered in three groups *Penk and Ccl5* (cluster 1), *Ifng* (cluster 2) and *Tgfb, Il6, Il1b, Cxcl2 and Tnfa* (cluster 3). No statistical differences were observed between PS and control adult male and female mice. In agreement, the percentages of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells, regardless of their conventional or memory phenotype, were not significantly different between control and PS mice **(Figure S2B).** The expression of genes significant for the epithelium homeostasis grouped the female mice together, unlike males that were separated by the hierarchical clustering depending on their stress status. Ctrl male mice were represented by an increase in the means of the expression of *Ocln, Nfkb, Ppara, Tjp1, Acot12, Angptl4, Muc2, Mmp7, Cd36, Ahr, Ephx2* and *Reg3g,* whereas PS males were represented by an increase of *Tff3, Ocln, Nfkb, Ppara, Tjp1* and *Acot12* **(Figure 1E)**. In female mice, the means of expression of these genes were lower than in male mice. No statistical difference between control and PS mice were observed **(Table S5)**.

In conclusion, prenatal stress induced visceral hypersensitivity in the absence of any sign of colonic inflammation in adulthood.

Prenatal stress induces a gut microbiota dysbiosis and alters gut microbiota spatial organization in adulthood.

Previous clinical studies investigating gut microbiota of IBS patients *vs.* healthy controls showed that IBS patients have a reduced bacterial diversity which can be linked to an altered microbial function. We measured the impact of prenatal stress on the offspring gut microbiota in adulthood **(Figure 2).** The 16S RNA analyses of the feces revealed a shift in the gut microbiota composition in PS mice that differed in male and female offspring. In males, PS mice showed a higher relative abundance of *Clostridium clostridioforme, Deltaproteobacteria, Desulfovibrionales* and *Blautia,* while the relative abundance of *Desulfovibrio* and *Desulfovibrionaceae* as well as *Tyzzerella* and *Clostridium colinum* was higher in control mice **(Figure 2A).** In females, the relative abundances of taxa from *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* phyla were higher than in control mice **(Figure 2B).** In both PS male and female offspring, the relative abundance of *Clostridium clostridioforme* was higher, whereas the relative abundance of *Lactobacillus animalis* was lower **(Figure 2A and 2B)**. These taxonomical differences were in accordance with a significant different and lower overall diversity, mostly based on Chao-1 index, related to rare species, for both PS male and female

mice **(Figure 2C and 2D)**. We also performed a PICRUSt-based predictive analysis of gut microbial functions. In males, PS mice showed a higher function related to secretion system whereas control mice displayed higher undefined enzyme families **(Figure 2E)**. In females, the predictive gut microbiome did not vary compared to control mice, which showed a higher galactose metabolism **(Figure 2F)**.

Beyond taxonomic and functional alteration of the gut microbiota, PS induced a spatial organizational change of the colonic microbiota. Fluorescent *in situ* hybridization was used to reveal the gut microbiota biogeography. In control mice of either sex, the bacteria were separated from the epithelial cells by a dense sterile mucus layer **(Figure 3)**. In contrast, in PS mice, some bacteria from the gut lumen invaded this layer as shown by 16S RNA labelling **(Figure 3).** By quantifying the 16S RNA labelled pixels inside the mucus layer, we showed that in PS mice, more bacteria crossed the border with the lumen and moved close to the epithelium **(Figure 3).**

Overall, these data show that prenatal stress induces gut microbiota dysbiosis and biogeographical change in adulthood.

The abundance of *L. animalis* is inversely correlated to visceral hypersensitivity

To extract the important differences between prenatally stressed and control mice, we first ran a PCA model followed by an OPLS-DA model. In both models, the mice were mainly located in within the 95% confidence intervals (black ellipse) **(Figure 4A and 4B)**. The plotted PCA scores showed the aggregation and the dispersion of the mice, and no outliers were identified **(Figure 4A)**. The OPLS-DA scores plot was fitted on Unit variance-scaled data and displays the classification effect. It showed a clear discrimination between the control (Ctrl) and PS groups **(Figure 4B)** and the underlying model was validated (R2X=35%, R2Y=78%, Q2=0.047) by a robust ($p<0.05$) permutation test **(Figure 4C).** 11 variables had a variable importance in projection (VIP) value ≥ 1 and a p-value ≤ 0.05, showing their importance for group separation in the OPLS-DA model. Besides visceral sensitivity (AUC), eight bacterial species were identified as important: *Clostridia unclassified, Paraeggerthella hongkongensis, Lactobacillus animalis, Clostridium clostridioforme, Clostridium colinum, Clostridiales unknown, Betaproteobacteria unknown, Bacteria unclassified* **(Figure 4D)**. We performed Spearman correlations between these variables to consolidate the link between the identified bacterial species and visceral hypersensitivity. *Clostridia unclassified, Lactobacillus animalis,*

Clostridiales unknown, Betaproteobacteria unknown and *Bacteria unclassified* were inversely correlated to visceral sensitivity **(Figure 4E)**. Among them, the higher correlation coefficient was reached with *Lactobacillus animalis* **(Figure 4E)**.

In conclusion, visceral hypersensitivity and microbiota composition were the main drivers of the separation between control and PS mice irrespective to their sex. Visceral hypersensitivity was strongly correlated to the decrease in the abundance of *L. animalis*.

L. murinus concentration is decreased in adult PS feces

In the mucus of control mice but not of PS mice, we identified by Maldi Tof the presence of *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus johnsonii/gasseri*. In 2020, the *Lactobacillus* genera regrouped 261 species very diverse from each other on the phenotypic, ecological and genotypic levels. Zheng *et al.* re-evaluated the taxonomy of *Lactobacillaceae* based on whole-genome sequencing and reclassified them into 25 genera [18]. On this basis, *Lactobacillus reuteri* is now classified as *Limosilactobacillus reuteri and Lactobacillus murinus* as *Ligilactobacillus murinus*. This latter species is closely related to another one, *Ligilactobacillus animalis* and differentiating them from one another remains an issue using the current 16S RNA sequencing pipelines [19]. The same observation is done for probe designing as it is difficult to find species-specific 16S RNA locations. Therefore, it is now recommended to identify them as a single species named *L. murinus/animalis*. As *L. murinus/animalis* was the only identified bacterial species to be correlated with visceral sensitivity, we focused our attention on the role of this bacterium in intestinal homeostasis. Whole genome sequencing of *Ligilactobacillus murinus,* identified in the mice and named strain IRSD_2020, allowed us to determine that it possessed few sequences different from the reference strain DSMZ-20602 **(Figure S1).** We then quantified *L. murinus* IRSD_2020 from mice fecal samples by Taqman® real-time PCR. *L. murinus* IRSD_2020 quantity was lower in the feces of PS mice in adulthood and was inversely correlated to the AUC of the visceral sensitivity **(Figure 5 A)**. The same results were obtained with primers and probe designed for the *L. animalis* strain DSMZ-20602 **(Figure 5B)**.

L. murinus produces analgesic lipopeptides

As the abundance of *L. murinus* IRSD_2020 was inversely correlated to the visceral sensitivity, we hypothesized that these bacteria were able to produce a metabolite decreasing

visceral sensitivity. Based on our previous study where we described the production of an analgesic GABA-containing lipopeptide by *Escherichia coli* strain Nissle 1917 [20], we quantified the concentration, relative to our internal standard *C16AsnGABA (C16AsnGABA with the fatty acid fully labelled with ^{13}C), lipopeptides containing GABA in *L. murinus* IRSD_2020. As no production of lipopeptides related to GABA was observed **(Figure 6A)** and as *L. murinus* IRSD_2020 did not express the enzymes implicated in GABA synthesis, we cultured *L. murinus* IRSD_2020 in the presence of GABA. Under this condition, *L. murinus* IRSD_2020 produced several lipopeptides containing GABA: C16PheGABA, C12AsnGABA, C16GluGABA, C14AsnGABA, C12IleGABA, C14IleGABA and C12AlaGABA **(Figure 6A)**. The total concentration of lipopeptides containing GABA and the concentration of C12AsnGABA, C16GluGABA, C14AsnGABA, C14IleGABA and C12AlaGABA were significantly increased in bacteria cultured with GABA **(Figure 6A)**. In mouse, colon, we quantified C12AsnGABA, C16GluGABA, C14AsnGABA, C12IleGABA and C14IleGABA **(Figure 6B)**. In the colon of PS mice, the total concentration of lipopeptides containing GABA and the concentration of C12AsnGABA and C14AsnGABA were significantly decreased compared to control **(Figure 6B)**. Finally, in a last set of experiments, CRD experiments were performed before and 30 minutes after intracolonic administration of C14AsnGABA in male and female adult PS mice. The treatment by the lipopeptide decreased the visceral hypersensitivity induced by PS **(Figure 6C)**. We identified that *L. murinus* IRSD_2020 was capable of producing lipopeptides containing GABA in the presence of GABA. The treatment of sensitive mouse by C14AsnGABA, whose concentration was decreased in their colon, restored a normal visceral sensitivity.

Discussion

The onset of IBS in adulthood is associated with a higher number of early life adverse events [13]. However, due to the lack of data on prenatal period in humans, it is difficult to establish the causal link between stressful events during pregnancy and intestinal homeostasis disruption in adulthood. Here, in a mouse model of prenatal stress (PS), we show that the male and female offspring of stressed mothers present the main characteristics of IBS in adulthood: visceral hypersensitivity, no overt colonic inflammation, and a gut microbiota dysbiosis. Our results confirmed observations made in a rat model of prenatal stress where an increase in visceral sensitivity and no change of paracellular permeability have been described [21], [22]. In opposition with stress performed in adulthood [23], we did not observe an

increase in plasma corticosterone concentration in PS mice as previously observed in PS rodents [14], [21], [24]. So, corticosterone is probably not implicated in the increase in visceral sensitivity observed in this model at adulthood. Nevertheless, we cannot exclude a long-lasting impact of corticosterone during foetal development and infancy. The gut microbiota alteration was characterized in both male and female offspring by an increased abundance of *Clostridium clostridioforme* and a decreased abundance of *L. animalis* and *L. murinus. Clostridium clostridioforme*, reclassified as *Enterocloster clostridioformis* in 2019 [25], is hardly dissociable from two other bacteria: *C. bolteae* and *C. hathewayi,* all found in human feces [26]. These 3 species are therefore usually considered as the *Clostridium clostridioforme* group. A higher abundance of this group in the feces have been linked to the onset of autism spectrum disorders (ASD) in children [27], [28]. In rodents, PS has also been associated to an increase of ASD-like behaviours in adulthood [29], [30], but, in the absence of microbiota analysis, a direct link between PS, *Clostridium clostridioforme* and ASD is still unknown. More studies are needed to decipher the implication of *Clostridium clostridioforme* in IBS but its correlation with behavioural disorders is indicative for a role in psychological comorbidities such as anxiety and depression.

The decreased abundance of the *Lactobacillus* genera seems to be an universal response to chronic stress as this observation has been made in various chronic stress models, applied either in adulthood or in early life, and in different species [14], [21] [31]–[33]. In humans, studies looking at the correlation between stress in pregnancy and the baby's gut microbiota have also highlighted that infants of stressed mothers present a decreased abundance of *Lactobacillus* in their feces [34]. However, how chronic stress impacts the *Lactobacillus* population and its duration remain to be determined. Given we previously showed that C12AsnGABA, a lipopeptide containing GABA (the main inhibitory transmitter of the central nervous system) exhibit analgesic properties in visceral pain [20], the inverse correlation between *L. murinus* abundance and visceral sensitivity, led us to hypothesize that this bacterium was implicated in the maintenance of the normosensitivity by producing analgesic molecules. As expected *L. murinus* IRSD_2020, in the presence of GABA, Produced GABA-containing lipopeptides, such as C16PheGABA, C12AsnGABA, C16GluGABA, C14AsnGABA, C12IleGABA, C14IleGABA and C12AlaGABA highlighting the redundancy to produce lipopeptides linked to GABA.

GABA production is widely distributed in all three life kingdoms: animals, plants and bacteria. In bacteria, the most studied producers belong to the lactic acid producing bacteria, a group that includes *Lactobacilli* such as *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei, L. rhamnosus*, and *L. delbrueckii* [35], [36]. GABA is synthetized by a pyridocal- 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme glutamate decarboxylase (GAD; EC 4.1.1.15) by irreversible α-decarboxylation of L-glutamate and consumption of one cytoplasmic proton [37]. Glutamate import and GABA export generally occur in bacteria simultaneously via a specific glutamate/gamma-amino butyrate antiporter. These enzymes are encoded by *gadB* and *gadC* genes [38]. *L. murinus* does not possess the enzymes required to produce GABA. Nevertheless, when cultivated in a GABA enriched medium, this species is able to form lipopeptides linked to GABA. *In vivo* GABA could be provided to *L. murinus* by two other hardly differentiable *Lactobacillus* species also found in the feces of the mice, *L. reuteri* and the *L. johnsonii/gasseri* cluster. These two latter species tend to form dual-species biofilm in the gut, and are often clustering with *L. murinus* [39]. *L. reuteri* possesses the GABA production machinery [40], and the close interactions between these species in the gut could be one of the mechanisms through which *L. murinus* acquires the GABA to produce lipopeptides containing GABA. GABA-containing lipopeptides are produced by other bacterial species, contributing with *L. murinus* to the basal tonus of GABA lipopeptides in the colon. The total concentration of lipopeptides containing GABA including C12AsnGABA and C14AsnGABA were decreased in the colon of PS offspring, showing that in addition to the taxonomic changes, PS induces an alteration of the metabolic capacity of the gut microbiota.

GABA analogues such as gabapentine or pregabalin decrease abdominal pain in IBS patients, but their serious side effects (hepatotoxicity and neurotoxicity) prevent their chronic use [41]–[43]. The analgesic properties of GABA lipopeptides, as demonstrated here for C14AsnGABA, *in vivo* show that they could represent a novel therapeutic track to explore in IBS patients. Our results show that the production of lipopeptides-GABA by commensal bacteria could be one of the mechanisms of communication between the host and its gut microbiota implicated in the upkeep of intestinal homeostasis. The use of probiotics producing lipopeptides linked to GABA or GABA enriched foods to provide GABA to those bacterial species could represent new approaches to target GABA receptors and decrease abdominal pain in IBS patients.

References

[1] P. Enck *et al.*, « Irritable bowel syndrome », *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 2, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.14.

[2] I. M. Gralnek, R. D. Hays, A. Kilbourne, B. Naliboff, et E. A. Mayer, « The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life », *Gastroenterology*, vol. 119, n° 3, p. 654-660, sept. 2000, doi: 10.1053/gast.2000.16484.

[3] M. Simrén, H. Törnblom, O. S. Palsson, L. Van Oudenhove, W. E. Whitehead, et J. Tack, « Cumulative Effects of Psychologic Distress, Visceral Hypersensitivity, and Abnormal Transit on Patient-reported Outcomes in Irritable Bowel Syndrome », *Gastroenterology*, vol. 157, n° 2, p. 391-402.e2, août 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.019.

[4] S. M. Collins, « A role for the gut microbiota in IBS », *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, n° 8, p. 497-505, août 2014, doi: 10.1038/nrgastro.2014.40.

[5] L. Wilmes, J. M. Collins, K. J. O'Riordan, S. M. O'Mahony, J. F. Cryan, et G. Clarke, « Of bowels, brain and behavior: A role for the gut microbiota in psychiatric comorbidities in irritable bowel syndrome », *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 33, n° 3, mars 2021, doi: 10.1111/nmo.14095.

[6] T. Surdea-Blaga, « Psychosocial determinants of irritable bowel syndrome », *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, n° 7, 2012, doi: 10.3748/wjg.v18.i7.616.

[7] E. B. Blanchard *et al.*, « The role of stress in symptom exacerbation among IBS patients », *J. Psychosom. Res.*, vol. 64, n° 2, févr. 2008, doi: 10.1016/j.jpsychores.2007.10.010.

[8] L. Chang, « The Role of Stress on Physiologic Responses and Clinical Symptoms in Irritable Bowel Syndrome », *Gastroenterology*, vol. 140, n° 3, mars 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.032.

[9] H. Yaribeygi, Y. Panahi, H. Sahraei, T. P. Johnston, et A. Sahebkar, « The impact of stress on body function: A review », *EXCLI J.*, vol. 16, p. 1057-1072, 2017, doi: 10.17179/excli2017-480.

[10] R. A. Caparros-Gonzalez, A. de la Torre-Luque, B. Romero-Gonzalez, J. M. Quesada-Soto, F. Alderdice, et M. I. Peralta-Ramírez, « Stress During Pregnancy and the Development of Diseases in the offspring: A Systematic-Review and Meta-Analysis », *Midwifery*, vol. 97, juin 2021, doi: 10.1016/j.midw.2021.102939.

[11] O. Olén, O. Stephansson, A. S. Backman, H. Törnblom, M. Simrén, et M. Altman, « Pre- and perinatal stress and irritable bowel syndrome in young adults – A nationwide register-based cohort study », *Neurogastroenterol. Motil.*, 2018, doi: 10.1111/nmo.13436.

[12] E. X. S. Low, M. N. K. Al Mandhari, C. C. Herndon, E. X. L. Loo, E. H. Tham, et K. T. H. Siah, « Parental, perinatal, and childhood risk factors for development of irritable bowel syndrome: A systematic review », *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2020. doi: 10.5056/jnm20109.

[13] K. Bradford *et al.*, « Association Between Early Adverse Life Events and Irritable Bowel Syndrome », *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, nº 4, avr. 2012, doi: 10.1016/j.cgh.2011.12.018.

[14] E. Jašarević *et al.*, « The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus », *Nat. Neurosci.*, vol. 21, nº 8, août 2018, doi: 10.1038/s41593-018-0182-5.

[15] M. Weinstock, « Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior », *Neurobiol. Stress*, vol. 6, p. 3-13, févr. 2017, doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.004.

[16] E. A. Thévenot, A. Roux, Y. Xu, E. Ezan, et C. Junot, « Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses », *J. Proteome Res.*, vol. 14, nº 8, p. 3322-3335, août 2015, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354.

[17] Y. Guitton *et al.*, « Create, run, share, publish, and reference your LC-MS, FIA-MS, GC-MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 93, p. 89-101, déc. 2017, doi: 10.1016/j.biocel.2017.07.002.

[18] J. Zheng *et al.*, « A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae », *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 70, nº 4, p. 2782-2858, avr. 2020, doi: 10.1099/ijsem.0.004107.

[19] S. H. Park et K. Itoh, « Species-specific oligonucleotide probes for the detection and identification of Lactobacillus isolated from mouse faeces », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 99, nº 1, p. 51-57, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02584.x.

[20] T. Pérez-Berezo *et al.*, « Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 », *Nat. Commun.*, vol. 8, nº 1, p. 1314, nov. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01403-9.

[21] A. V. Golubeva *et al.*, « Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood », *Psychoneuroendocrinology*, vol. 60, p. 58-74, oct. 2015, doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.06.002.

[22] H.-J. Wang *et al.*, « Prenatal maternal stress induces visceral hypersensitivity of adult rat offspring through activation of cystathionine-β-synthase signaling in primary sensory neurons », *Mol. Pain*, vol. 14, p. 1744806918777406, déc. 2018, doi: 10.1177/1744806918777406.

[23] I. Bernatova *et al.*, « Chronic Stress Produces Persistent Increases in Plasma Corticosterone, Reductions in Brain and Cardiac Nitric Oxide Production, and Delayed Alterations in Endothelial Function in Young Prehypertensive Rats », *Front. Physiol.*, vol. 9, p. 1179, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01179.

[24] M. van Bodegom, J. R. Homberg, et M. J. A. G. Henckens, « Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure », *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, p. 87, 2017, doi: 10.3389/fncel.2017.00087.

[25] K. N. Haas et J. L. Blanchard, « Reclassification of the Clostridium clostridioforme and Clostridium sphenoides clades as Enterocloster gen. nov. and Lacrimispora gen. nov., including reclassification of 15 taxa », *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 70, nº 1, p. 23-34, janv. 2020, doi: 10.1099/ijsem.0.003698.

[26] S. M. Finegold *et al.*, « Clostridium clostridioforme: a mixture of three clinically important species », *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 24, nº 5, p. 319-324, mai 2005, doi: 10.1007/s10096-005-1334-6.

[27] S. M. Finegold *et al.*, « Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism », *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 35, nº Suppl 1, p. S6-S16, sept. 2002, doi: 10.1086/341914.

[28] Y. Song, C. Liu, et S. M. Finegold, « Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, nº 11, p. 6459-6465, nov. 2004, doi: 10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004.

[28] M. Weinstock, « The long-term behavioural consequences of prenatal stress », *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 32, nº 6, p. 1073-1086, août 2008, doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.002.

[30] D. K. Kinney, K. M. Munir, D. J. Crowley, et A. M. Miller, « Prenatal stress and risk for autism », *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 32, nº 8, p. 1519-1532, oct. 2008, doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.06.004.

[31] L. Hantsoo et B. S. Zemel, « Stress gets into the belly: Early life stress and the gut microbiome », *Behav. Brain Res.*, vol. 414, p. 113474, sept. 2021, doi: 10.1016/j.bbr.2021.113474.

[32] A. R. Mackos, V. A. Varaljay, R. Maltz, T. L. Gur, et M. T. Bailey, « Role of the Intestinal Microbiota in Host Responses to Stressor Exposure », *Int. Rev. Neurobiol.*, vol. 131, p. 1-19, 2016, doi: 10.1016/bs.irn.2016.08.002.

[35] E. Jašarević, C. D. Howard, A. M. Misic, D. P. Beiting, et T. L. Bale, « Stress during pregnancy alters temporal and spatial dynamics of the maternal and offspring microbiome in a sex-specific manner », *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 44182, mars 2017, doi: 10.1038/srep44182.

[34] M. A. C. Zijlmans, K. Korpela, J. M. Riksen-Walraven, W. M. de Vos, et C. de Weerth, « Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota », *Psychoneuroendocrinology*, vol. 53, p. 233-245, mars 2015, doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.01.006.

[35] R. Dhakal, V. K. Bajpai, et K.-H. Baek, « Production of gaba (γ - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review », *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.*, vol. 43, nº 4, p. 1230-1241, oct. 2012, doi: 10.1590/S1517-83822012000400001.

[36] J.-H. Seok, K.-B. Park, Y.-H. Kim, M.-O. Bae, M.-K. Lee, et S.-H. Oh, « Production and Characterization of Kimchi with Enhanced Levels of γ-Aminobutyric Acid », p. 7.

[37] H. Ueno, « Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase », *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 10, nº 1, p. 67-79, oct. 2000, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00114-4.

[38] D. Ma *et al.*, « Structure and mechanism of a glutamate–GABA antiporter », *Nature*, vol. 483, nº 7391, p. 632-636, mars 2012, doi: 10.1038/nature10917.

[39] X. B. Lin *et al.*, « The evolution of ecological facilitation within mixed-species biofilms in the mouse gastrointestinal tract », *ISME J.*, vol. 12, nº 11, p. 2770-2784, nov. 2018, doi: 10.1038/s41396-018-0211-0.

[40] Y. Cui, K. Miao, S. Niyaphorn, et X. Qu, « Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria: A Systematic Review », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, nº 3, Art. nº 3, janv. 2020, doi: 10.3390/ijms21030995.

[41] M.-M. Zhang *et al.*, « Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain », *Mol. Brain*, vol. 7, nº 1, p. 47, juin 2014, doi: 10.1186/1756-6606-7-47.

[42] Y. A. Saito *et al.*, « Randomised clinical trial: pregabalin vs placebo for irritable bowel syndrome », *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 49, nº 4, p. 389-397, 2019, doi: 10.1111/apt.15077.

[43] M. Gros, B. Gros, J. E. Mesonero, et E. Latorre, « Neurotransmitter Dysfunction in Irritable Bowel Syndrome: Emerging Approaches for Management », *J. Clin. Med.*, vol. 10, nº 15, Art. nº 15, janv. 2021, doi: 10.3390/jcm10153429.

Figure legends

Figure 1. Prenatal stress induces visceral hypersensitivity in the adult offspring. (A) Visceral motor response to colorectal distensions was measured in control (white) or PS (black) mice, in both male (square) and female (circle) offspring. The results are expressed as area under the curve (AUC) of VMR in response to the pressures of distension (15, 30, 45 and 60 mmHg). Data are expressed as scatter dot plot with the mean. Statistical analysis was perform using a Mann-Whitney test. **p<0.01, significantly different from the control group. (n=14-19 mice/group, 3 independent experiments). **(B)** Intestinal paracellular permeability was monitored 4 hours after oral administration of FITC dextran 4 kDa. FITC fluorescence was quantified in the serum of control mice (white) or PS mice (black), in the male (square) and female (circle) offspring. Data are expressed as scatter dot plot with the mean. Statistical analysis was perform using a Mann-Whitney test. (n=12-22 mice/group, 3 independent experiments). **(C)** Colon thickness, macroscopic and microscopic colon damage scores of control mice (white) or PS mice (black), in the male (square) and female (circle) offspring. Data are expressed as scatter dot plot with the mean (ctrl male vs PS male and Ctrl female vs PS female; n= 10-24 mice/group, 3 independent experiments). **(D)** Heat map of polyunsaturated fatty acid (PUFA) metabolites quantified by LC-MS/MS. Data are shown in a matrix format: each row represents a single PUFA metabolite, and each column represents a group of mice: C M = control males, PS M = PS males, C F = control females, PS F = PS females. Each color patch represents the normalized quantity of PUFA metabolites (row) in a group of mice (column), with a continuum of quantity from bright green (lowest) to bright red (highest). The pattern and length of the branches in the dendrogram on the left, reflect the relatedness of the PUFA metabolites, on top the relatedness of the mouse groups. The dashed red line is the dendrogram distance used to cluster PUFA metabolites and mouse groups. (n=15 mice/group, 2 independent experiments). **(E)** Heatmap of mRNA expression of genes coding for enzymes implicated in PUFA metabolism (top panel), colonic immune response (middle panel) and gut homeostasis (bottom panel). Data are shown in a matrix format: each row represents a single PUFA metabolite, and each column represents a group of mice: C M = control males, PS M = PS males, C F = control females, PS F = PS females. Each color patch represents the normalized gene expression (row) in a group of mice (column), with a continuum of quantity from bright green (lowest) to bright red (highest). The pattern and length of the branches in the dendrogram on the left, reflect the relatedness of the gene expression on top the relatedness

of the mouse groups. The dashed red line is the dendrogram distance used to cluster genes and mouse groups. (n=15 mice/group, 3 independent experiments)

Figure 2. Prenatal stress induces a gut microbiota dysbiosis both in male and female mice.
Linear Discriminant Analysis (LDA) score in male (A) and female (B) PS mice vs. control mice; diversity indices in male (C) and female (D) PS mice vs. control mice; PICRUSt-based predicted gut microbial functions in male (E) and female (F) PS mice vs. control mice. (n=15 mice/group)

Figure 3. Prenatal stress alters gut microbiota spatial organization in adulthood.
Bacteria were labelled with the universal probe Eub338 (red), wheat germ agglutinin-FITC was used to stain the polysaccharide-rich mucus layer (green), and the epithelial cell nucleus was stained with DAPI (blue). Bacteria penetration into the mucus was measured by image processing on Fiji by quantifying the number of 16S RNA labelled pixel between the edge of the lumen to the edge of the epithelium (n=12 mice/group; 4 images/mice, 2 independent experiments).

Figure 4. The abundance of *L. animalis* is inversely correlated to visceral hypersensitivity in adulthood
Multivariate analysis of the complete cohort: **(A)** Two-dimensional PCA (R2 = 52%) score plot of data generated from 56 samples (control, n = 28, blue; PS, n = 28, red). Each dot corresponds to an individual. **(B)** Two-dimensional O-PLS-DA (R2X = 35%, R2Y = 78%, Q2=0.37) score plot of data generated from 56 samples (control, n = 28, blue; PS, n = 28, red). Each dot corresponds to an individual. The black ellipse corresponds to a 95% confident interval based on the Hotelling's T^2. **(C)** Permutation test for O-PLS-DA model validation **(D)** Boxplots of discriminant (Variable Importance in Projection > 1) and significant (FDR-corrected p value of Wilcoxon test < 0.05) variables. **(E)** Spearman correlations were used to analyse the correlation between the faecal microbiota abundances and visceral motor response to colorectal distension expressed in AUC, in male (square) and female (circle) offspring. p and r values are indicated on each graph.

Figure 5. *L. murinus* IRSD_2020 concentration is decreased in PS mouse feces

The levels of the *L. murinus* strain IRSD_2020 **(A)** and of the reference *L. murinus/animalis* strain DSMZ 20602 **(B)** were quantified by TaqMan® real-time PCR in the feces of control mice (white) or PS mice (black), in the male (square) and female (circle) offspring. Data are expressed as scatter dot plot with the mean. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. ****p<0.0001, significantly different from the control group (n=27-36 mice/group, 3 independent experiments). Spearman correlations were used to analyze the correlation between the fecal bacteria quantity and visceral motor response to colorectal distension expressed in AUC, in male (square) and female (circle) offspring. P and r values are indicated on each graph.

Figure 6*. L. murinus* IRSD_2020 produces an analgesic lipopeptide

(A) Individual (left panel) and total (right panel) concentration of lipopeptides quantified by LC-MS/MS in the bacterial pellets of *L. murinus* IRSD_2020 cultivated without (white circle) or with GABA (8mg/mL) (black circle). Data are expressed as scatter dot plot with the mean (n=9-11). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01; ***p<0.001, significantly different from the corresponding *L. murinus* IRSD_2020 without GABA **(B)** Individual (left panel) and total (right panel) concentration of lipopeptides quantified by LC-MS/MS in the colon of male (square) and female (circle) control (white) and PS mice (black). Data are expressed as scatter dot plot with the mean (n=9-10). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01, significantly different from the corresponding control group **(C)** Visceral motor response to colorectal distension was measured for PS mice, in both male (square) and female (circle) offspring. Measurements were done before (white) and after intracolonic administrations of C14AsnGABA (black). The results are expressed as area under the curve (AUC) of VMR in response to the pressures of distension (15, 30, 45 and 60 mmHg). Data are expressed as scatter dot plot with the mean. Statistical analysis was perform using a Wilcoxon test. **p<0.01, significantly different from the untreated group. (n=15 mice/group, 2 independent experiments)

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the animal care facility, Genetoul, anexplo, US006/INSERM, Toulouse, MetaToul (Toulouse metabolomics & fluxomics facilities, www.metatoul.fr) which is part of the French National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 and the platform Aninfimip, an EquipEx ('Equipement d'Excellence') supported by the French government through the Investments for the Future program (ANR-11-EQPX-0003). We acknowledge the technical assistance provided by the personnel of Flow cytometry Infinity core facility and the cellular imaging facility of INSERM 1291 connected to 'Toulouse Réseau Imagerie' network. N.C is a recipient of the grants from ANR (ANR-18-CE14-0039 & ANR-20-CE14-0011), AS and NC are funded by FRC. AS, PP and GG are supported by Centre National de la Recherche Scientifique. PP and GG received support from CNRS, University of Strasbourg and Investments for the Future program (ANR-17-EURE-022, EURIDOL graduate school of pain). GG, CP and SM received a scholarship from Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. PP is a senior fellow of the Institut Universitaire de France.

Figure 1

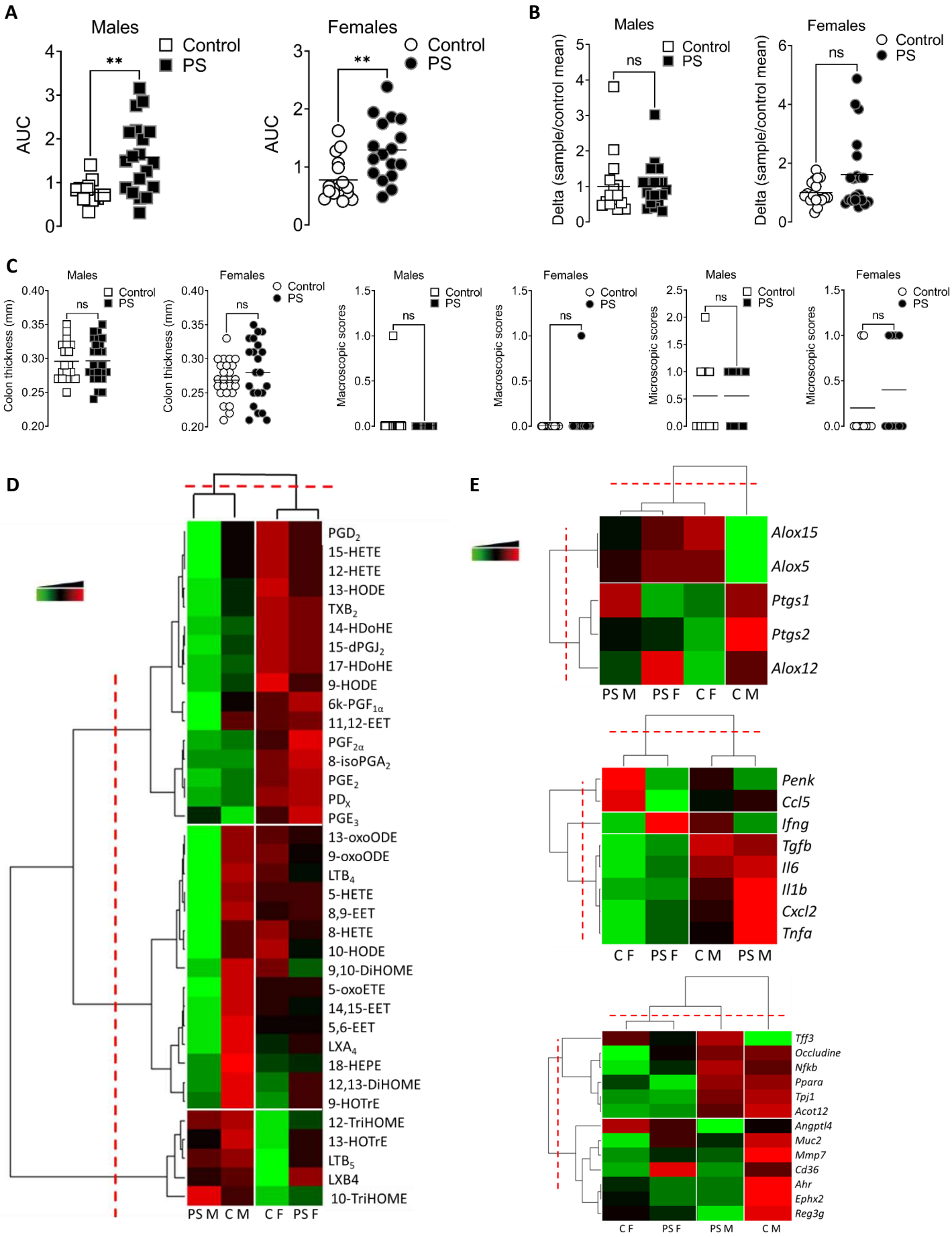

A
Males
Females
Control
PS
AUC
**
B
Delta (sample/control mean)
ns
C
Colon thickness (mm)
Macroscopic scores
Microscopic scores
D
PGD2
15-HETE
12-HETE
13-HODE
TXB2
14-HDoHE
15-dPGJ2
17-HDoHE
9-HODE
6k-PGF1α
11,12-EET
PGF2α
8-isoPGA2
PGE2
PDX
PGE3
13-oxoODE
9-oxoODE
LTB4
5-HETE
8,9-EET
8-HETE
10-HODE
9,10-DiHOME
5-oxoETE
14,15-EET
5,6-EET
LXA4
18-HEPE
12,13-DiHOME
9-HOTrE
12-TriHOME
13-HOTrE
LTB5
LXB4
10-TriHOME
PS M C M C F PS F
E
Alox15
Alox5
Ptgs1
Ptgs2
Alox12
PS M PS F C F C M
Penk
Ccl5
Ifng
Tgfb
Il6
Il1b
Cxcl2
Tnfa
C F PS F C M PS M
Tff3
Occludine
Nfkb
Ppara
Tpj1
Acot12
Angptl4
Muc2
Mmp7
Cd36
Ahr
Ephx2
Reg3g
C F PS F PS M C M

Figure 2

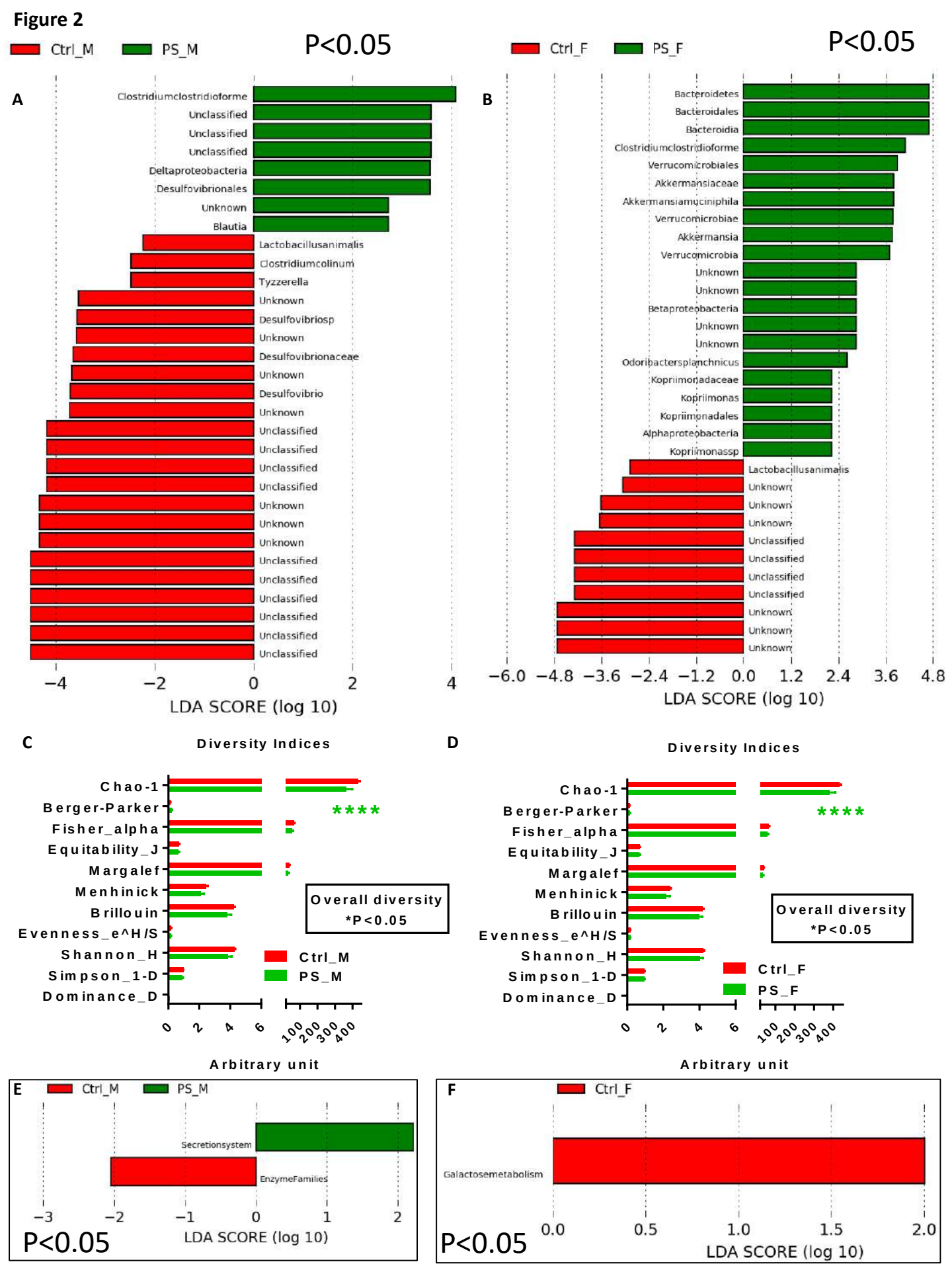
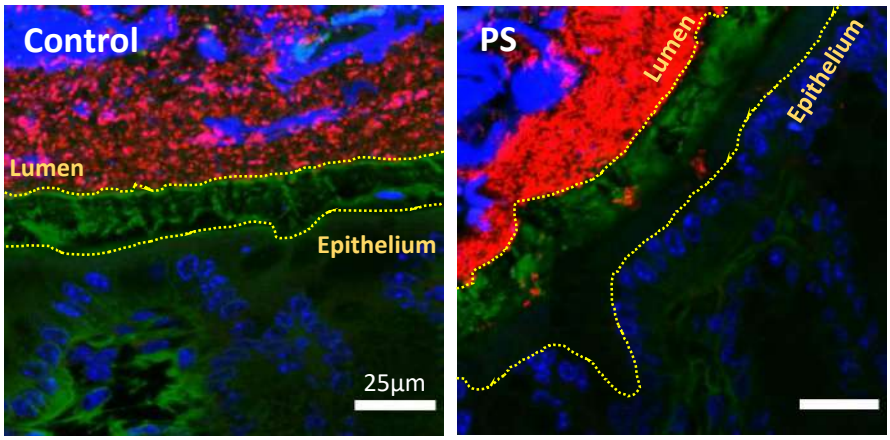

Ctrl_M
PS_M
P<0.05
A
Clostridiumclostridioforme
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Deltaproteobacteria
Desulfovibrionales
Unknown
Blautia
Lactobacillusanimalis
Clostridiumcolinum
Tyzzerella
Unknown
Desulfovibriosp
Unknown
Desulfovibrionaceae
Unknown
Desulfovibrio
Unknown
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Unknown
Unknown
Unknown
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Unclassified
−4
−2
0
2
4
LDA SCORE (log 10)
Ctrl_F
PS_F
P<0.05
B
Bacteroidetes
Bacteroidales
Bacteroidia
Clostridiumclostridioforme
Verrucomicrobiales
Akkermansiaceae
Akkermansiamuciniphila
Verrucomicrobiae
Akkermansia
Verrucomicrobia
Unknown
Unknown
Betaproteobacteria
Unknown
Unknown
Odoribactersplanchnicus
Kopriimonadaceae
Kopriimonas
Kopriimonadales
Alphaproteobacteria
Kopriimonassp
Lactobacillusanimalis
Unknown
Unknown
Unknown
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Unclassified
Unknown
Unknown
Unknown
−6.0 −4.8 −3.6 −2.4 −1.2 0.0 1.2 2.4 3.6 4.8
LDA SCORE (log 10)
C
Diversity Indices
Chao-1
Berger-Parker
Fisher_alpha
Equitability_J
Margalef
Menhinick
Brillouin
Evenness_e^H/S
Shannon_H
Simpson_1-D
Dominance_D
****
Overall diversity
*P<0.05
Ctrl_M
PS_M
0 2 4 6
100 200 300 400
Arbitrary unit
D
Diversity Indices
Chao-1
Berger-Parker
Fisher_alpha
Equitability_J
Margalef
Menhinick
Brillouin
Evenness_e^H/S
Shannon_H
Simpson_1-D
Dominance_D
****
Overall diversity
*P<0.05
Ctrl_F
PS_F
0 2 4 6
100 200 300 400
Arbitrary unit
E
Ctrl_M
PS_M
Secretionsystem
EnzymeFamilies
−3 −2 −1 0 1 2
LDA SCORE (log 10)
P<0.05
F
Ctrl_F
Galactosemetabolism
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0
LDA SCORE (log 10)
P<0.05

Figure 3


Control
Lumen
Epithelium
25µm
PS
Lumen
Epithelium

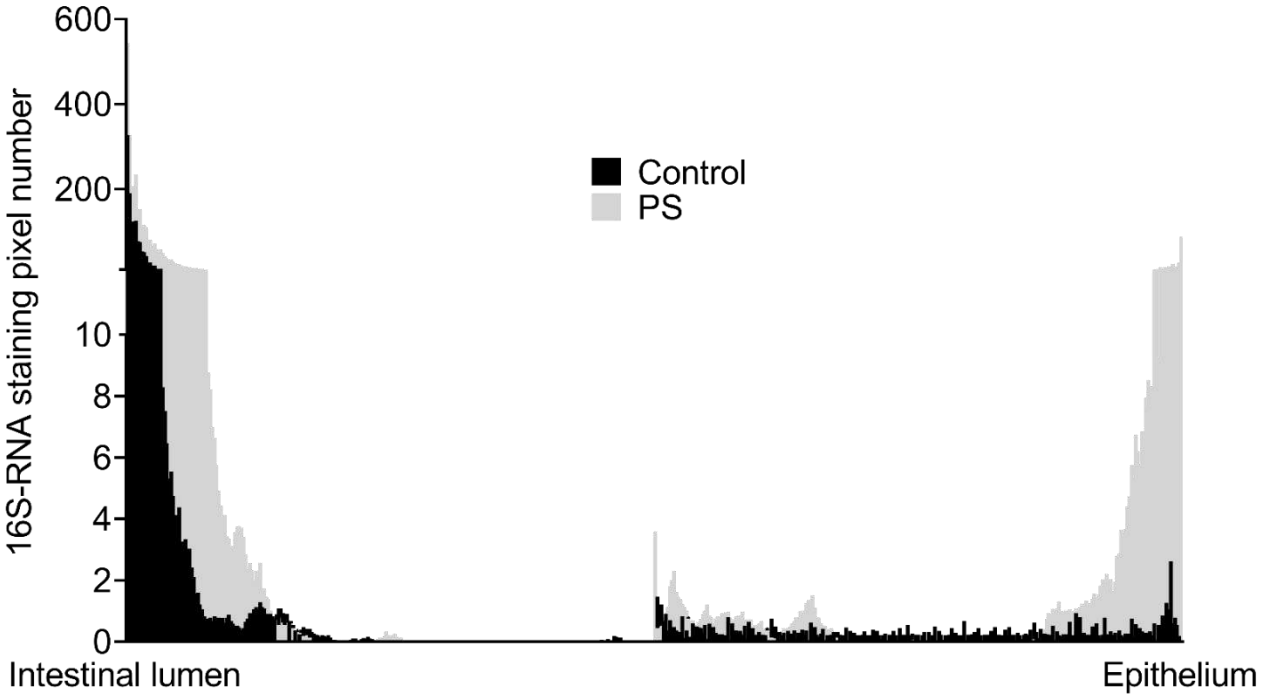

600
400
200
10
8
6
4
2
0
16S-RNA staining pixel number
Control
PS
Intestinal lumen
Epithelium

Figure 4

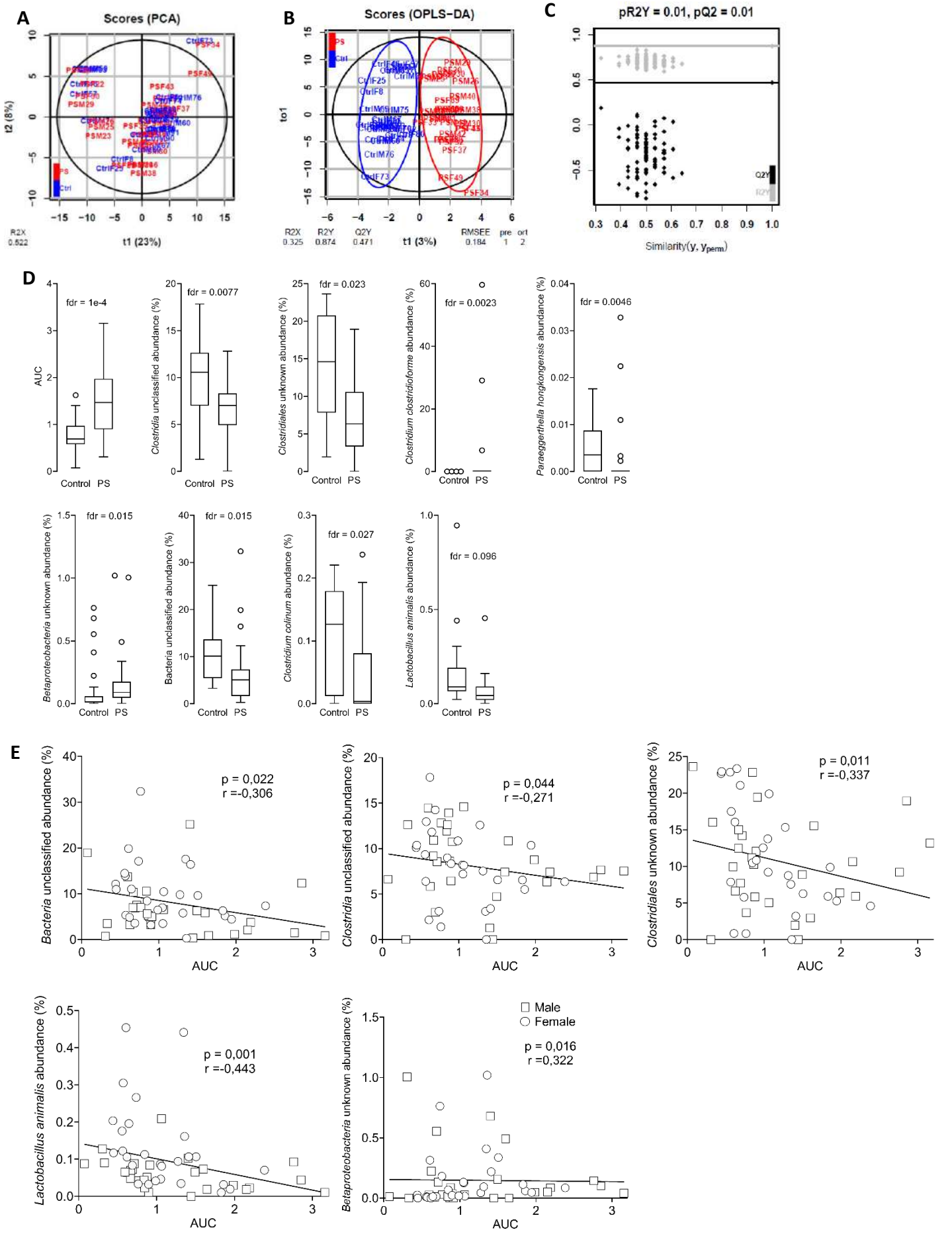

A
Scores (PCA)
t1 (23%)
t2 (8%)
B
Scores (OPLS-DA)
t1 (3%)
to1
C
pR2Y = 0.01, pQ2 = 0.01
Similarity(y, yperm)
D
AUC
fdr = 1e-4
Clostridia unclassified abundance (%)
fdr = 0.0077
Clostridiales unknown abundance (%)
fdr = 0.023
Clostridium clostridioforme abundance (%)
fdr = 0.0023
Paraeggerthella hongkongensis abundance (%)
fdr = 0.0046
Betaproteobacteria unknown abundance (%)
fdr = 0.015
Bacteria unclassified abundance (%)
fdr = 0.015
Clostridium colinum abundance (%)
fdr = 0.027
Lactobacillus animalis abundance (%)
fdr = 0.096
Control PS
E
Bacteria unclassified abundance (%)
p = 0,022
r =-0,306
Clostridia unclassified abundance (%)
p = 0,044
r =-0,271
Clostridiales unknown abundance (%)
p = 0,011
r =-0,337
Lactobacillus animalis abundance (%)
p = 0,001
r =-0,443
Betaproteobacteria unknown abundance (%)
Male
Female
p = 0,016
r =0,322
AUC

Figure 5

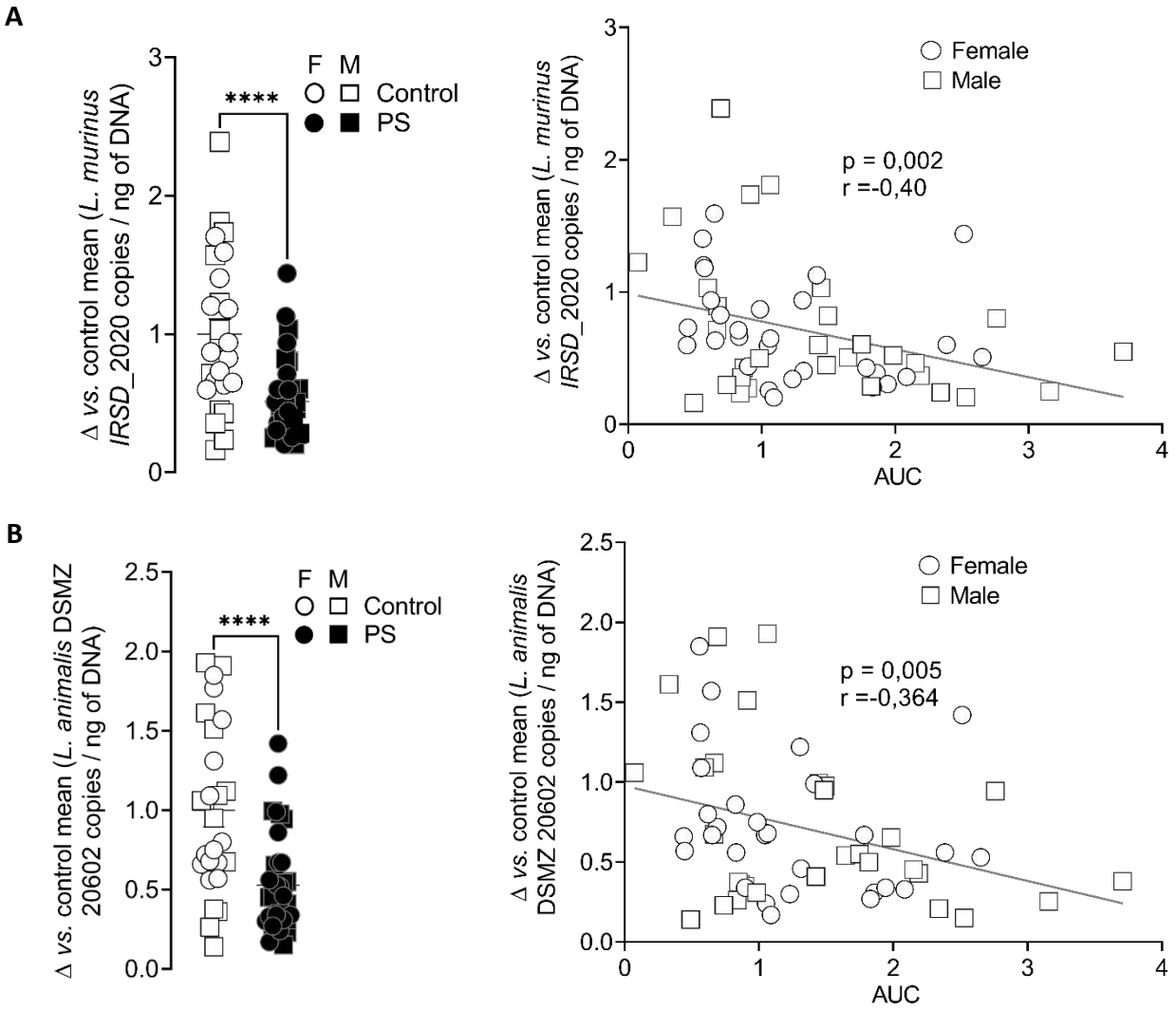
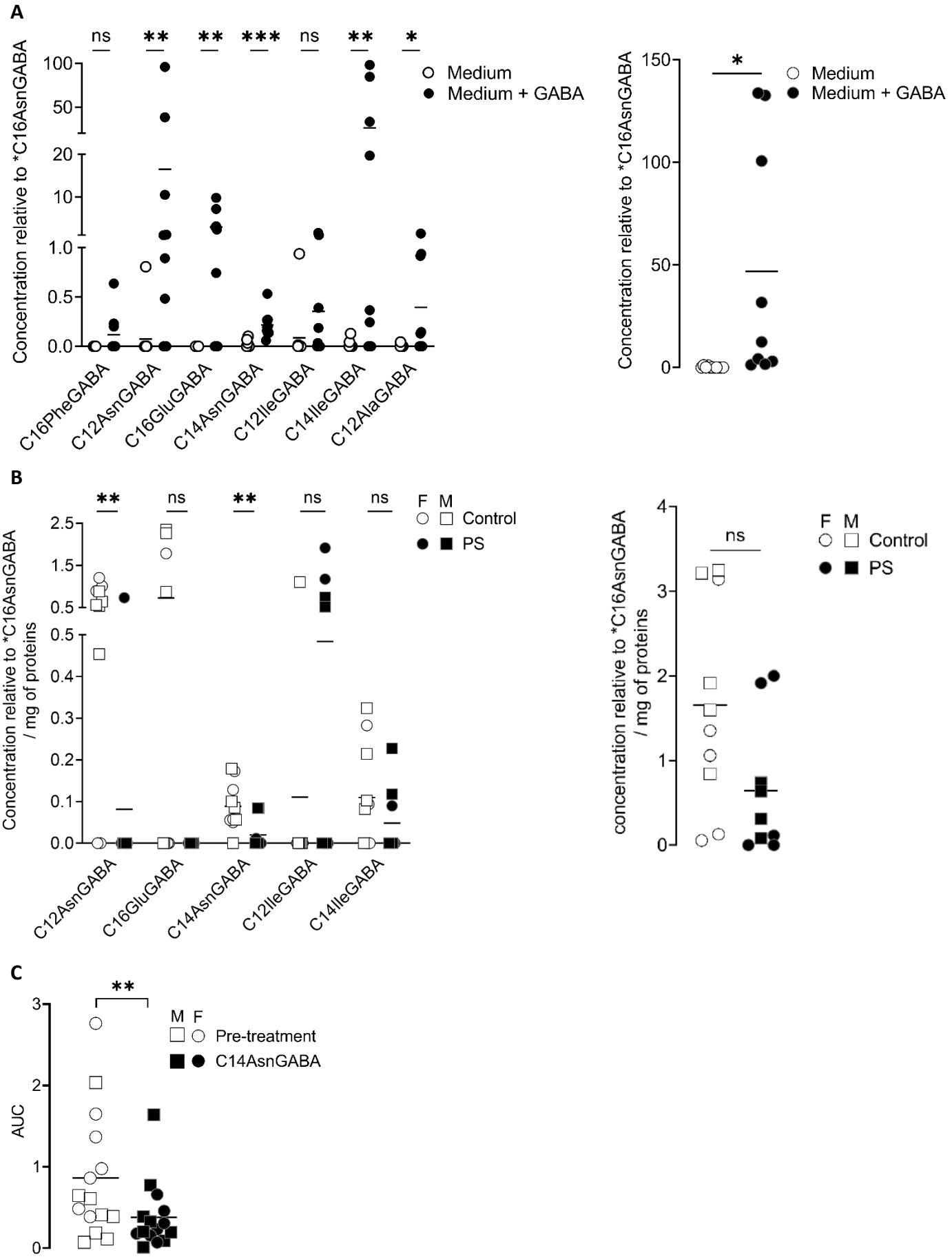

A
Δ vs. control mean (L. murinus IRSD_2020 copies / ng of DNA)
****
F M
Control
PS
Female
Male
p = 0,002
r =-0,40
AUC
B
Δ vs. control mean (L. animalis DSMZ 20602 copies / ng of DNA)
****
F M
Control
PS
Female
Male
p = 0,005
r =-0,364
AUC

Figure 6


A
ns
**
**
***
ns
**
*
Medium
Medium + GABA
Concentration relative to *C16AsnGABA
100
50
20
10
1.0
0.5
0.0
C16PheGABA
C12AsnGABA
C16GluGABA
C14AsnGABA
C12IleGABA
C14IleGABA
C12AlaGABA
*
150
100
50
0
B
**
ns
**
ns
ns
F M
Control
PS
Concentration relative to *C16AsnGABA / mg of proteins
2.5
1.5
0.5
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
C12AsnGABA
C16GluGABA
C14AsnGABA
C12IleGABA
C14IleGABA
ns
4
3
2
1
0
C
**
M F
Pre-treatment
C14AsnGABA
AUC
3
2
1
0

Identification of bacterial lipopeptides as key players in prenatal stress-induced visceral pain

Camille Petitfils[1]*, Sarah Maurel[1]*, Gaëlle Payros[1], Amandine Hueber[2,3], Bahija Agaiz[1], Geraldine Gazzo[4], Rémi Marrocco[5], Frédéric Auvray[1], Geoffrey Langevin[6], Jean-Paul Motta[1], Pauline Floch[1,7], Marie Tremblay-Franco[8,9], Jean-Marie Galano[6], Alexandre Guy[6], Thierry Durand[6], Simon Lachambre[5], Justine Bertrand Michel[2,3], Abdelhadi Saoudi[5], Eric Oswald[1,7], Pierrick Poisbeau[4], Gilles Dietrich[1], Matteo Serino[1], Pauline le Faouder[2,3#], Nicolas Cenac[1#].

[1] IRSD, Université de Toulouse-Paul Sabatier, INSERM, INRAe, ENVT, UPS, Toulouse, France

[2] MetaboHUB-MetaToul, National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics, Toulouse, France

[3] I2MC, Université de Toulouse, Inserm, Université Toulouse III – Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France.

[4] Centre National de la Recherche Scientifique, Institute for Cellular and Integrative Neuroscience (INCI), University of Strasbourg, Strasbourg, France.

[5] INFINITY, Université de Toulouse-Paul Sabatier, INSERM, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France

[6] Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Montpellier, France

[7] CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de bactériologie-hygiène, Toulouse, France

[8] Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Toulouse University, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, F-31027 Toulouse, France.

[9] Metatoul-AXIOM Platform, MetaboHUB, Toxalim, INRAE, F-31027 Toulouse, France.

* Joint first author

Joint last author

Index

Supplementary methods……..2

Supplementary tables……..10

Supplementary figures……15

Supplementary references……17

Supplementary methods

Colorectal distension

Nickel-chrome electrodes were implanted in the abdominal external oblique musculature of anesthetized mice in order to detect EMG activity as previously described [1]. CRD was performed 3 days post-surgery by inserting a distension catheter (Fogarty catheter for arterial embolectomy, 4 F; Edwards Lifesciences, Nijmegen, Netherlands) into the colon at 5 mm from the anus. The balloon was progressively inflated in a stepwise of 15mmHg (from 0 to 60mmHg) performing 10s distension for each pressure and with resting intervals of 5min (n=14-19 mice/group, 3 independent experiments). In a second set of experiments, mice submitted to stress (n=15 per group, 2 independent experiments) were treated with a 100µL intracolonic injection of C14snGABA (10µM) or its vehicle (EtOH 40%) 30min before CRD. The results were expressed as the area under the curve from 15 to 60mmHg.

Permeability and macro and microscopic scores

To determine paracellular permeability, mice were gavaged with dextran 4kDa-FITC (25mM; Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Four hours after, mice were sacrificed. Blood was collected for FITC quantification in the serum and colons were removed. Length and thickness were measured and macroscopic colonic tissue damages were scored from 0 to 3 for the intensity of adhesion and strictures, from 0 to 2 for the intensity of edema, erythema, ulceration and diarrhea and from 0 to 1 (absent or present) for the mucus, hemorrhage and fecal blood; the maximal score being 17. For histological examination, a piece of colon located at 2cm proximal to the anus was resected, fixed in 10% phosphate buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin–eosin. Slides were examined and graded for cellular infiltration, mucosal architecture alteration and submucosal oedema from 0 to 3 (absent, mild, moderate and severe) and vasculitis, muscular thickening, crypt abscess and goblet cell depletion from 0 to 1 (absent or present); the maximal score being 13.

Real time PCR analysis

Colon biopsies were crushed in 500µL of Trizol (Invitrogen, Thermofisher scientific, Saclay, France) in Precellys lysing kit tubes (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, France) placed in a Precellys (2823g, 30 seconds twice; Bertin Technologies). After addition of

chloroform and centrifugation (15 minutes, 11292 g at 4°C), the supernatant containing the RNA was removed. Ethanol 70% (vol/vol) was added and the contents were placed in columns (GenElute® mammalian total RNA miniprep kit, Sigma Aldrich). The RNA was extracted according to the manufacturer recommendations. Subsequently the RNA was dosed in a nanodrop (implenGmbH, Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). RNA (3µg) preparations from colon of mice were used for the total RNA reverse-transcription with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Fisher Scientific) using random hexamers (Fisher Scientific) for priming. Transcripts encoding Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (Hprt), Trefoil factor 3 (Tff3), Mucin 2 (Muc2), Occludin (Ocln), Zonula occludens-1 (Tjp1), Regenerating islet-derived 3 gamma (Reg3γ), Matrilysin (Mmp7), Tumor necrosis factor alpha (Tnfα), Chemokine (C-Cmotif) ligand 5 (Ccl5), Transforming growth factor beta (Tgfβ), Interleukin 6 (Il6), Interleukine 1 beta (Il1β), Nuclear factor kappa B (Nfκb), Chemokine (C-X-C motif) 2 ligand Cxcl2, Lipoxygenase 15 (Alox15), Lipoxygenase 5 (Alox5), Lipoxygenase 12 (Alox12), Cyclooxygenase 1 (Ptgs1), Cyclooxygenase 2 (Ptgs2), Pro-enkephaline (Penk), Interferon gamma (Ifnγ), Peroxysome proliferator-Activated Receptor(PPARα), Acyl-CoA Thioesterase 12 (Acot12), Angiopoietine like 4 (Angptl4), Cluster of differenciation 36 (CD36), Aryl hydrocarbon receptor (Ahr), glucocorticoid receptor (Nr3C1) and soluble epoxy hydrolase (Ephx2), were quantified by real-time PCR using specific forward and reverse primers (**Table S1**), the kit Takyon SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogentec) and the LightCycler480II (Roche Diagnostics, Meylan, France). Hierarchical clustering was performed, and heat maps were obtained with R (www.rproject.org). Gene expression were transformed to z scores and clustered based on 1− Pearson correlation coefficient as distance and the Ward algorithm as agglomeration criterion.

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) measurements

PUFA metabolites were quantified from mice colons by mass spectrometry after lipid extraction as previously described [2]. After the addition of 500µL of PBS, and 5µL deuterated Internal Standard (IS) mixture (5-HETEd8, LxA4d4 and LtB4d4), the colons were crushed in lysing MatrixA tubes in a precellys (Bertin Technologies). After two crush cycles (6.5 ms−1, 30s), 10µL of suspensions were withdrawn for protein quantification and 0.3mL of cold methanol (MeOH) were added. The samples were centrifuged at 1016 × g for 15min (4°C) and the resulting supernatants were submitted to solid phase extraction of lipids using HLB plate

(OASIS® HLB 30 mg, 96-well plate, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Briefly, plates were conditioned with 500µL MeOH and 500µL H2O/MeOH (90:10, v/v). Samples were loaded at a flow rate of about one drop per 2s and, after complete loading, columns were washed with 500µL H2O/MeOH (90:10, v/v). The phase were thereafter dried under aspiration and lipids were eluted with 750µL MeOH. Solvent was evaporated under N2 and samples were resuspended with 140µL MeOH and transferred into a vial (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Finally, the 140µL of methanol were evaporated and our sample resuspended with 10µL of methanol for liquid chromatography/mass spectrometry analysis. 6-keto-prostaglandin F1 alpha (6kPGF$_{1\alpha}$), thromboxane B2 (TxB2), Prostaglandin E2 (PGE$_2$), 8-iso Prostaglandin A2 (8-isoPGA$_2$), Prostaglandin E3 (PGE$_3$), 15-Deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ$_2$), Prostaglandin D2 (PGD$_2$), Lipoxin A4 (LxA4), LxB4, Resolvin D1 (RvD1), Resolvin D2 (RvD2), Resolvin D5 (RvD5), 7-Maresin 1 (7-Mar1), Leukotriene B4 (LtB4), Leukotriene B5 (LtB5), Protectin Dx (PDx), 18-hydroxyeicosapentaenoic (18-HEPE), 5,6-dihydroxyeicosatetraenoic acid (5,6-DiHETE), 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE), 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE), 8-hydroxyeicosatetraenoic acid (8-HETE), 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE), 17-hydroxydocosahexaenoic acid (17-HDoHE), 14-hydroxydocosahexaenoic acid (14-HDoHE), 14,15-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET), 11,12-epoxyeicosatrienoic acid (11,12-EET), 8,9-epoxyeicosatrienoic acid (8,9-EET), 5,6-epoxyeicosatrienoic acid (5,6-EET), 5-oxoeicosatetraenoic acid (5-oxoETE), Prostaglandin F2α, (PGF$_{2\alpha}$), 13-Hydroxyoctadecadienoic acid (13oxoODE), 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9oxoODE), 10-hydroxyoctadecadienoic acid (10-HODE), 9,10-dihydroxy-12-octadecenoic acid (9,10-DiHOME), 12,13-dihydroxy-12-octadecenoic acid (12,13-DiHOME), 9-hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic acid (9-HOTrE), 13-hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid (13-HOTrE), 9,10,13-trihydroxy-11-octadecenoic acid (10-TriHOME) and 9,12,13-trihydroxy-11E-octadecenoic acid (12-TriHOME) were quantified in mouse colons. To simultaneously separate 42 lipids of interest and three deuterated internal standards (5-HETEd8, LxA4d4 and LtB4d4), LC-MS/MS analysis was performed on an ultrahigh-performance liquid chromatography system (UHPLC; Agilent LC1290 Infinity) coupled to an Agilent 6460 triple quadrupole MS (Agilent Technologies) equipped with electrospray ionization operating in negative mode. Reverse-phase UHPLC was performed using a Zorbax SB-C18 column (Agilent Technologies) with a gradient elution. The mobile phases consisted of water, acetonitrile (ACN), and formic acid (FA) [75:25:0.1 (v/v/v)] (solution A) and ACN and FA

[100:0.1 (v/v)] (solution B). The linear gradient was as follows: 0% solution B at 0 min, 85% solution B at 8.5min, 100% solution B at 9.5min, 100% solution B at 10.5min, and 0% solution B at 12 min. The flow rate was 0.4ml/min. The autosampler was set at 5°C, and the injection volume was 5µL. Data were acquired in multiple reaction monitoring (MRM) mode with optimized conditions. Peak detection, integration, and quantitative analysis were performed with MassHunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies). Blank samples were evaluated, and their injection showed no interference (no peak detected), during the analysis. Hierarchical clustering was performed, and heat maps were obtained with R (www.rproject.org). PGJ2, RVD1, RVD2, RVD5, 7Mar1, 5,6-DiHETE were not detected in our samples. PUFA metabolite amounts were transformed to z scores and clustered based on 1− Pearson correlation coefficient as distance and the Ward algorithm as agglomeration criterion.

Dosage of the corticosterone

Mice were anesthetized with ketamine/xylasine and submandibular blood was collected into tubes and centrifuged (15min, 8000rpm) to separate the serum. Serum samples were stored at -80°C until analysis. Corticosterone levels were determined using the corticosterone AlphaLISA detection kit (PerkinElmer, AL3020C) following manufacturer's instructions. The volumes of all reagents were adjusted for the use 5µl of serum or standard. The serum samples were diluted 1:5 into 1X diluent. The corticosterone concentrations in serum samples were expressed in ng/ml. (n=8 to 10 mice/group)

Phenotypic analysis of mesenteric lymph node cells

11 weeks old controls or prenatally stressed mice were euthanized and their mesenteric lymph nodes were harvested, mechanically disrupted, filtered, and then stained with conjugated antibodies for flow cytometry analysis. Cells were stained with labelled antibody directed against surface protein (TCRβ, CD4, CD8β, CD44, CD62L) and with a viability dye to exclude dead cells. We used the Foxp3/transcription factor staining buffer and Perm/Wash buffer according to the manufacturer’s instructions (e-Biosciences) to fix and permeabilize the cells prior to intracellular staining with anti-Foxp3 labelled antibody. Data were collected on LSR-Fortessa cytometer (BD Biosciences) and analyzed using the FlowJo software.

Fecal bacterial DNA extraction

Feces were collected and frozen at -80°C until use. 15 feces/ group chosen from 3 independent experiments. Metagenomic DNA was extracted from the feces using a QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden,Germany) according to the manufacturer's instructions. Quickly, the feces were crushed in the inhibitex buffer at (6.5 ms−1, 3x30 s), placed at 95°C and then were centrifuged 2min, at 16 000g, at room temperature to pellet the stool particles. 200µL of the supernatant were added to 15µL of proteinase K and AL buffer and incubated 10min at 70°C. 200µL of EtOH were added and the samples were added in the spin columns and centrifuged at 16 000g at room temperature for 1 minute. The supernatant was removed and 500µL of washing buffer 1 was added. After centrifugation at 16 000g at room temperature for 1 minute, the supernatant was removed and 500µL of washing buffer 2 was added. After centrifugation at 16 000g at room temperature for 3 minutes, the supernatant was removed and 50µL of the elution buffer was added. Finally, the samples were centrifuged for 1 minute at 16 000g at room temperature and the DNA was collected. The DNA was then quantified using a Nanodrop.

Taxonomic and predicted functional analysis of gut microbiota

Total DNA was extracted from freshly-collected snap-frozen feces as already described [3]. The 16S rRNA gene V3-V4 regions were targeted by the 357wf-785R primers and analyzed by MiSeq at RTLGenomics (http://rtlgenomics.com/, Texas, USA). An average of 29795 sequences was generated per sample. A complete description of the applied bioinformatic filters is available (http://www.rtlgenomics.com/docs/Data_Analysis_Methodology.pdf). LDA scores were drawn by the Huttenhower Galaxy web application (http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/) via the LEfSe algorithm [4]. The predictive functional analysis (gut microbiome) of gut microbiota was performed via PICRUSt [5]. Diversity indices were calculated with the software PAST4 [6].

Biofilm

For fluorescent *in situ* hybridization, a specimen of colon with a feces was resected, fixed in carnoy (60% MeOH, 30% chloroform, 10% acetic acid), embedded in paraffin, sectioned, and labelled with the universal bacterial 16 S fluorescent rRNA probe EUB338-Cy3, 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'Cy5, Eurofins) at 10µL/mL, wheat germ agglutinin-FITC 1/1000

(Sigma-Aldrich L4895) was used to stain the polysaccharide-rich mucus layer, and the epithelial cell nucleus was stained with DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen P36935). Bacterial penetration into the mucus was measured by image processing on Fiji by quantifying the number of 16S RNA labelled pixel between the edge of the lumen to the edge of the epithelium (n=12 mice/group; 4 images/mice, 2 independent experiments). The mucus zone was manually traced, and an arbitrary distance was assigned to each pixel from the middle to the epithelial cells border. Cyanine 5 labelled pixels in this zone were assigned to their corresponding distance. The distance of each pixel in regard to the luminal compartment and the number of labeled pixel at each distant point were represented.

Whole genome sequencing of *Ligilactobacillus murinus* IRSD_2020

Genomic DNA from *L. murinus* IRSD_2020 and *L. animalis* DSMZ 20602 were purified from 200 µL overnight cultures with MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche Diagnostics France SAS, Meylan, France) and sequenced in 2x150 bp paired-end by illumina® NextSeq500 (IntegraGen SA, Evry, France) with an 80x coverage. Libraries were obtained by enzymatic fragmentation using a 5X WGS Fragmentation mix kit (Enzymatics Inc., Beverly, MA, USA). The sequence data generated were deposited in the NCBI BioProject database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/) under the accession the number PRJNA770189.

Quantification of *Ligilactobacillus murinus* IRSD_2020 and *Ligilactobacillus animalis using* TaqMan® real-time PCR

Primers and probes included in the real-time PCR assay targeting *L. murinus* were selected in an 834 bp-long open reading frame (ORF) whose sequence was retrieved from *L. murinus* IRSD_2020 genome and was found with >99% similarity in other *L. murinus* strains and with <77% similarity in *Streptococcus suis* (**Figure S1**). Primers and probes included in the real-time PCR assay targeting *L. animalis* were selected in the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) region. All the primers and probes (**Table S2**) were designed with TaqMan® Primer and Probes Design Tool (Genescript, Leiden, the Netherlands) and purchased from Eurofins Genomics (Germany). Detection was achieved with LightCycler480II (Roche Diagnostics, Meylan, France) real-time PCR system according to the manufacturer's instructions. TaqMan® qPCRs were performed in 10µL reactions containing: 1X iQ Supermix (Biorad), 0.3µM each primer, 0.2µM probe, 2µl purified DNA diluted 1:10 and nuclease-free water. The bacterial DNA qPCR was

performed using the following conditions: 95°C for 3 min, followed by 45 cycles consisting of 95°C for 15 s and 60° for 60 s. Duplicate reactions were run for all samples. The cycle threshold of each sample was then compared with a DNA standard. DNA standard was obtained by purification of *Ligilactobacillus* genomic DNA from the 10ml pellet of overnight culture using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Ten-fold serial dilutions of DNA standard were used to generate a standard curve. The data was expressed as *Ligilactobacillus* copies per ng of isolated DNA.

Bacterial culture

L. murinus IRSD_2020 was grown on Lactobacilli MRS broth (Difco, Fisher scientific SAS, Illkirch, France) – agar plates supplemented with cysteine chloride monohydrate 0.5g.L-1. After 24 hours of incubation at 37°C, 3 colonies were seeded in 30 mL of MRS broth supplemented with cysteine chloride monohydrate 0.5g.L-1 (Merck–Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) and incubated overnight at 37°C. Cultures have been performed with or without GABA (8 mg/mL; Sigma A2129, St. Quentin Fallavier, France) in the medium. All the culture steps have been performed in a hypoxic environment ensured by using a Whitley H35hypoxystation (don Whitley scientific, Bingley, United Kingdom) and all the incubations were done in an anaeropack jar (Fisher scientific SAS, Illkirch, France) with an anaeroGen sachet (Fisher scientific SAS, Illkirch, France) to ensure an anaerobic environment. Lipopeptides containing GABA were quantified in these bacteria.

Bacterial lipopeptide quantification

To quantify bacterial lipopeptides, mass-spectrometry method has been adapted from the C12AsnGABA quantification method previously described [7]. For the extraction, 500µL of Tris buffer (pH=9), 1mL of MeOH and 5µL of IS *C16AsnGABA were added to the bacterial pellets or colon samples and crushed with a Fast Prep instrument (MP Biomedicals), using two cycles (6,5m.s-1, 30s). Ten µL of suspension were withdraw for protein quantification with Biorad assays, then, 6.6mL of water were added to the homogenate. Samples were centrifuged at 1016 x g for 15min (4°C) and the supernatants submitted to SPE using HLB plates (HLB, 30mg, Waters). Plates were conditioned with 750µL ethyl acetate, 750µL MeOH and 750µL H2O:MeOH (90:10; v/v). Samples were loaded at a flow rate of one drop per 2s and SPE plates washed using 1mL H2O:MeOH (90:10; v/v) followed by 1mL heptane. Lipopeptides were

eluted using 1mL AcN, 1mL MeOH and 1mL AcOEt. Eluent were carefully removed from the plate, and transferred to a Pyrex tube, dried under nitrogen gas and reconstituted in 10µL MeOH for LC-QqQ (ou LC-LRMS) analysis. Extract was stored at -20°C before LC-MS analysis. High-performance liquid chromatography system was a Shimadzu Mikros LC system, equipped with a thermostated autosampler SIL-30AC, a rack changer II, a Nexera Mikros binary pump, a degasser on-line DGU-20A3R and a LTO-Mikros column oven. The analytical column was a CSH C18 column Waters (1 x 100mm; 2,7µm) and was maintained at 40°C. The mobile phases consisted of water:FA (99.9:0.1; v/v) (A) and acetonitrile:FA (99.9:0.1, v/v) (B). Flow rate was 0.1mL.min-1. The multi-step gradient starts with 30% B at 0 min, 80% B at 13 min, 100% B at 13.5min, 100% B at 16 min, and at 16.5 min 30% B until 18min. The chromatography system was coupled online to a triple quadrupole mass spectrometer Shimadzu 8060 equipped with a ESI source in negative mode and was optimized as follow: nebulizer: 2 L.min-1; desolvation line: 250°C; heating-block: 450°C, heating gaz flow: 10L.min-1, and no drying gas was used. Argon gas (purity, >99.9995%) was used for collision-induced dissociation (CID). For each metabolite the MRM transition (**Table S3**) was optimized on the pure standard to get the best selectivity and the best sensitivity with a qualitative and a quantitative transition and was programmed to monitor a 2min-window (expected chromatographic retention time ± 1min). The dwelltime were optimized for each compound and were set between 15 and 100msec. Peak detection, integration, and quantitative analysis were performed with LabSolution software (Version 5.99 SP2), Shimadzu.

Supplementary Table

Supplementary Table S1 QPCR Primers

Transcript	Forward	Reverse
Hprt	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGAT	CCCCGTTGACTGATCATTACAG
Alox15	TCCGGGGATGGAGAAGCTACA	TCCGCTTCAAACAGAGTGCCT
Alox5	TCTTCCTGGCACGACTTTGCTG	GCAGCCATTCAGGAACTGGTAG
Ptgs1	CACTTCTATGCTGGTGGACTATG	CTTGATGACATCCACAGCCACAT
Ptgs2	TCAAGACAGATCATAAGCGAG	AAAGGCGCAGTTTATGTTGTC
Alox12	TGTTGCCACCATGAGATGCCT	CCACCTGTGCTCACTACCTGA
Penk	CGACATCAATTTCCTGGCGT	AGATCCTTGCAGGTCTCCCA
Ccl5	ACTCCCTGCTGCTTTGCCTAC	TTCCTTCGAGTGACAAACACGA
Ifng	CAGCAACAGCAAGGCGAAA	AGCTCATTGAATGCTTGGCG
Tgfb	GACCCCCACTGATACGCCT	GCTGAATCGAAAGCCCTGTA
Il6	TCTGGGAAATCGTGGAAATGAG	TTCTGCAAGTGCATCATCGTTG
Il1b	ACCTTCCAGGATGAGGACATGAG	CATCCCATGAGTCACAGAGGATG
Cxcl2	AGCCCCCCTGGTTCAGAAA	TCCAGGTCAGTTAGCCTTGCC
Tnfa	CCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC	GGTCTGGGCCATAGAACTGATG
Tff3	TGCAGATTACGTTGGCCTGTC	TGGAGTCAAAGCAGCAGCC
Ocln	TGGATGACTACAGAGAGGAGAGT	TCCTCTTGATGTGCGATAATTTGC
Nfkb	ATGGCCCATACCTTCAAATAT	TCTCACTAGAGGCTCCCGGAA
Ppara	CCCTGTTTGTGGCTGCTATAATTT	GGGAAGAGGAAGGTGTCATCTG
Tjp1	GTTGGTACGGTGCCCTGAAAGA	GCTGACAGGTAGGACAGACGAT
Acot12	GGTGGTAAATGGAGACAAAC	ACGGCAGCACAACTGACCTTA
Angptl4	CTCCCAACGCCACCCACTTA	GCTGGATCTGGAAAAGTC
Muc2	CGGAACTCCAGAAAGAAGCCA	GGCAGTCAGACGCAAAGTTGTA
Mmp7	ACTGATGGTGAGGACGCAGG	CATCACAGTACCGGGAACAGAA
Cd36	ATGACGTGGCAAAGAACAGC	GAAGGCTCAAAGATGGCTCC
Ahr	CGCTTGATTTACAGAAATGGA	ATCTCGTACAACACAGCCTC
Ephx2	CGTTTATGCCACCAGATCCTGAT	ATGTTCTTCTCCAGTTCAGCCT
Reg3g	CCTCCATGATCAAAAGCAGTGG	GGATTCGTCTCCCAGTTGATGT
Nr3c1	TGGAGAGGACAACCTGACTTCC	ACGGAGGAGAACTCACATCTGG

Supplementary Table S2 Primers and probes used for TaqMan® real-time PCR assays

Target strain	Forward primer, reverse primer and probe sequence (5' - 3') *	Tm (°C)	Amplicon size (bp)
L. animalis DSMZ 20602	CTTTGCACGCAGGAGGTC	56	131
	CGCGGTGTTCTCGGTTATTT	56	
	FAM-ACGGTTCGATCCCGTTAAGCTCCA-TAMRA	62	
L. murinus IRSD_2020	CAAGAGAGTCGCTTACCAGAT	54	120
	ACCGATCTCATCTGCTGGTAG	56	
	FAM-CACCCGAAACAGTTGCAAAGCCTCT-TAMRA	62	

* FAM, 6-*carboxyfluorescein; TAMRA, tetramethylrhodamine*

Supplementary Table S3 SRM characterization with quantitative and qualitative transition, energy applied to generate the transition (EC et Q1/Q3PreBias), and retention time.

Compound	Quantitative MRM transition	Q1 Pre Bias (V)	EC (eV)	Q3 Pre Bias (V)	Qualitative transition	Retention time (min)
C12AlaGABA	384 → 366	30	11	18	384 → 102	6.3
C14AsnGABA	426 → 102	21	13	17	426 → 114	7.56
C14:1AlaGABA	381 → 102	27	31	25	381 → 88	7.82
C12ValGABA	383 → 280	12	31	27	383 → 102	8.28
C12LeuGABA	397 → 130	19	31	18	397 → 102	9.00
C14GABA	312 → 226	24	21	12	312 → 102	9.96
C14IleGABA	425 →130	22	31	20	425 → 102	11.23
C16LeuGABA	453 →130	18	34	17	453 → 130	13.53
C16PheGABA	487 → 384	19	27	19	487 → 102	13.72
C16GluGABA	465 → 102	23	37	10	465 → 96	9.13

Supplementary Table S4 PUFA metabolites quantification. Concentration of PUFA metabolites (pg/mg of proteins) in colons of control female (F-CTRL), prenatal stress female (F-PS), control male (M-CTRL) and prenatal stress male (M-PS) mice. Data are expressed as mean ± SEM. * P<0.05 compared to M-CTRL group.

	Mean ± SEM F-CTRL	**Mean ± SEM F-PS**	**Mean ± SEM M-CTRL**	**Mean ± SEM M-PS**
6kPGF$_{1\alpha}$	84094 ± 11155	96460 ± 18129	102285 ± 15010	83319 ± 10955
TxB2	14186 ± 2248	14363 ± 2054	14363 ± 2249	12422 ± 1552
PGE$_3$	119 ± 809,1	1088 ± 872,1	1043 ± 638,4	1124 ± 55,1
12-TriHOME	7403 ± 3675	6269 ± 4019	10106 ± 5272	9080 ± 7630
PGF$_{2\alpha}$	39315 ± 22747	38106 ± 30182	38567 ± 20861	34640 ± 21751
10-TriHOME	7273 ± 1151	7119 ± 1566	9635 ± 1476	10005 ± 2792
PGE$_2$	81692 ± 13047	81306 ± 14619	73924 ± 10831	67333 ± 9001
PGD$_2$	41575 ± 6777	47094 ± 10117	45921 ± 7468	35403 ± 5002
LxA4	299.6 ± 51.17	284.3 ± 64.08	451.7 ± 68.48	235 ± 41.8*
8isoPGA$_2$	3722 ± 813.1	3405 ± 635.5	2630 ± 553.5	2493 ± 497.6
PDx	63.35 ± 12.37	74.99 ± 16.27	44.32 ± 8.56	36.82 ± 7.55
LTB4	113.4 ± 8.87	128.8 ± 23.45	163.2 ± 46.16	77.65 ± 9.58
12,13-DiHOME	3201 ± 781.4	2712 ± 416.4	2846 ± 324.9	2315 ± 216.5
9,10-DiHOME	602.9 ± 83.68	672.1 ± 113.9	746.7 ± 86.87	576.8 ± 64.65
LTB5	12.32 ± 4.34	8.33 ± 2.95	18.97 ± 4.42	17.52 ± 5.56
9-HOTrE	252.2 ± 52.88	188.4 ± 45.42	339.9 ± 78.27	212.6 ± 48.24
18-HEPE	410.1 ± 75.52	424.5 ± 96.65	649.7 ± 105.2	417.2 ± 86.42
13-HOTrE	241.6 ± 37.01	191.1 ± 36.55	320.3 ± 62.67	305.7 ± 65.08
15-dPGJ$_2$	82.09 ± 18.78	98.98 ± 23.00	70.59 ± 15.24	51.02 ± 8.75
10-HODE	190.3 ± 22.19	223.8 ± 41.89	230.5 ± 22.65	158.4 ± 20.65*
13-HODE	96459 ± 10779	106878 ± 20588	98568 ± 10658	80067 ± 10688
9-HODE	61730 ± 8921	75650 ± 16158	61870 ± 8096	51689 ± 7987
15-HETE	34319 ± 5276	41162 ± 8370	37463 ± 5563	26467 ± 4157
17-HDoHE	11854 ± 1707	13107 ± 3004	9557 ± 1285	7839 ± 1297
13-oxoODE	12419 ± 1454	12511 ± 2367	14612 ± 2094	10072 ± 1406

14-HDoHE	8166 ± 1339	9148 ± 2303	7357 ± 1150	5853 ± 1105
8-HETE	1099 ± 162.9	1349 ± 281.1	1380 ± 222.1	834.9 ± 138.8*
12-HETE	34723 ± 6109	41615 ± 9584	39692 ± 8183	26444 ± 4933
9-oxoODE	12085 ± 1485	11803 ± 1944	13002 ± 1591	9445 ± 905.4
5-HETE	10863 ± 1769	11411 ± 2329	14354 ± 2112	8022 ± 1291*
14,15-EET	61.07 ± 9.75	104.0 ± 16.97	135.0 ± 16.54	71.73 ± 9.02*
5-oxoETE	4592 ± 681.1	5792 ± 1210	8173 ± 1256	4137 ± 717.6*
11,12-EET	147.2 ± 24.94	192.0 ± 44.51	202.0 ± 33.52	94.37 ± 16.43*
8,9-EET	1023 ± 230.2	1078 ± 253.4	1426 ± 254.7	794.2 ± 185.0
5,6-EET	441.4 ± 52.25	542.4 ± 94.27	789.1 ± 95.48	413.3 ± 59.73*

Supplementary Table S5 gene expression quantification. mRNA expression (-Δct) in colons of control female (F-CTRL), prenatal stress female (F-PS), control male (M-CTRL) and prenatal stress male (M-PS) mice. Data are expressed as mean ± SEM. * P<0.05 compared to M-CTRL group.

	Mean ± SEM F-CTRL	**Mean ± SEM F-PS**	**Mean ± SEM M-CTRL**	**Mean ± SEM M-PS**
Alox15	-4.80 ± 0.23	-5.03 ± 0.24	-5.98 ± 0.41	-5.34 ± 0.27
Alox5	-6.79 ± 0.08	-6.80 ± 0.12	-7.07 ± 0.18	-6.87 ± 0.09*
Ptgs1	-2.65 ± 012	-2.68 ± 0.08	-2.46 ± 0.13	-2.44 ± 0.11
Ptgs2	-4.32 ± 0.11	-4.22 ± 0.25	-4.00 ± 0.21	-4.20 ± 0.20
Alox12	-8.20 ± 0.19	-7.82 ± 0.23	-7.94 ± 0.30	-8.01 ± 0.19
Penk	-4.65 ± 0.13	-4.82 ± 0.13	-4.80 ± 0.29	-4.73 ± 0.11
Ccl5	-6.31 ± 0.23	-6.56 ± 0.15	-6.41 ± 0.22	-6.44 ± 0.15
Ifng	-13.96 ± 0.34	-13.47 ± 0.35	-13.89 ± 0.36	-13.56 ± 0.21
Tgfb	-2.37 ± 0.08	-2.29 ± 0.08	-1.96 ± 0.14	-1.92 ± 0.11
Il6	-8.58 ± 0.68	-8.31 ± 0.78	-7.49 ± 0.73	-7.44 ± 0.72
Il1b	-4.75 ± 0.53	-4.70 ± 0.49	-4.13 ± 0.65	-4.33 ± 0.59
Cxcl2	-5.58 ± 0.71	-5.40 ± 0.70	-4.84 ± 0.82	-5.02 ± 0.78
Tnfa	-6.03 ± 0.17	-5.90 ± 0.16	-5.56 ± 0.18	-5.81 ± 0.15
Tff3	-0.13 ± 1.19	-0.23 ± 1.21	-0.48 ± 1.43	-0.06 ± 1.21
Occludine	-0.58 ± 0.15	-0.50 ± 0.13	-0.46 ± 0.15	-0.47 ± 0.15
Nfkb	-1.25 ± 0.11	-1.07 ± 0.13	-0.94 ± 0.09	-0.86 ± 0.11
Ppara	-5.41 ± 0.25	-5.69 ± 0.28	-5.07 ± 0.25	-5.08 ± 0.20
Tjp1	-0.24 ± 0.15	-0.27 ± 0.11	0.37 ± 0.07	0.26 ± 0.10
Acot12	-11.16 ±0.10	-11.40 ± 0.12	-10.29 ± 0.44	-10.55 ± 0.48
Angptl4	-5,40 ± 0.20	-5,49 ± 0.21	-5.52 ± 0.24	-5.70 ± 0.18
Muc2	3.13 ± 0.12	3.41 ± 0.10	3.57 ± 0.27	3.30 ± 0.16
Mmp7	-5.72 ± 1.21	-5.28 ± 1.28	-4.07 ± 1.58	-5.52 ± 1.31
Cd36	-3.22 ± 0.14	-3.05 ± 0.15	-3.11 ± 0.17	-3.21 ± 0.16
Ahr	-0.68 ± 0.84	-0.85 ± 0.71	-0.13 ± 1.13	-0.86 ± 0.68
Ephx2	-1.69 ± 0.96	-1.86 ± 0.92	-1.20 ± 1.31	-2.05 ± 0.91
Reg3g	-9.35 ± 0.30	-9.37 ± 0.22	-9.22 ± 0.28	-9.35 ± 0.32

Supplementary figure

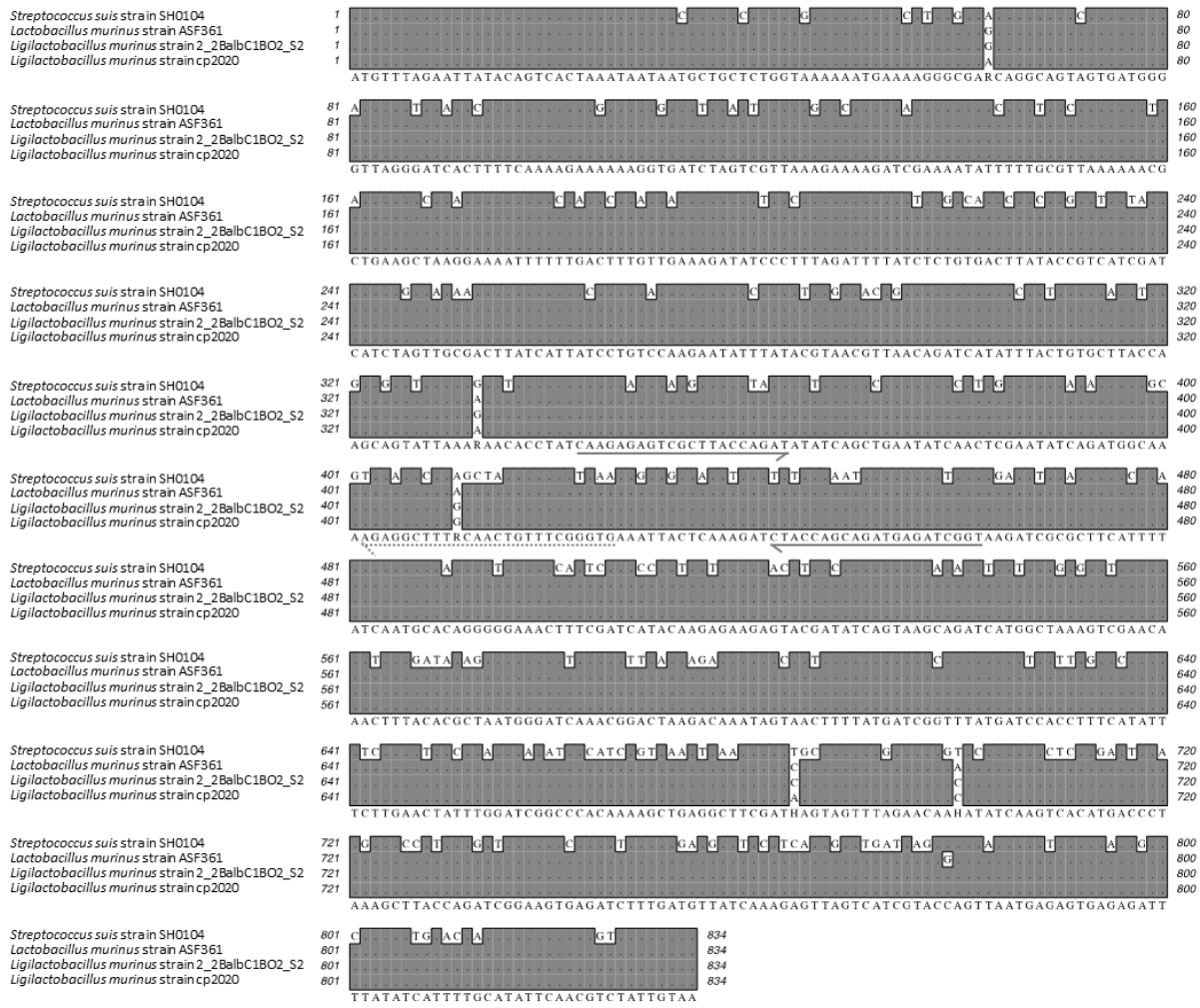


Figure S1. Primers and probe designed for the *L. murinus* specific real-time PCR assay. The nucleotide sequence of an open reading frame (ORF) identified in the *L. murinus* strain IRSD_2020 was aligned with those of a nearly identical ORF found in *L. murinus* strains ASF361 and 2_2BalbC1BO2_S2, and an ORF with less than 77% similarity found in *Streptococcus suis* strain SH0104. Identical and different nucleotides are reported with grey and white background, respectively. Solid and dashed arrows (5' to 3' orientation) indicate the positions of the primers and probe, respectively, which were selected in locations displaying nucleotide variability, in order to specifically target *L. murinus* IRSD_2020 by real-time PCR.

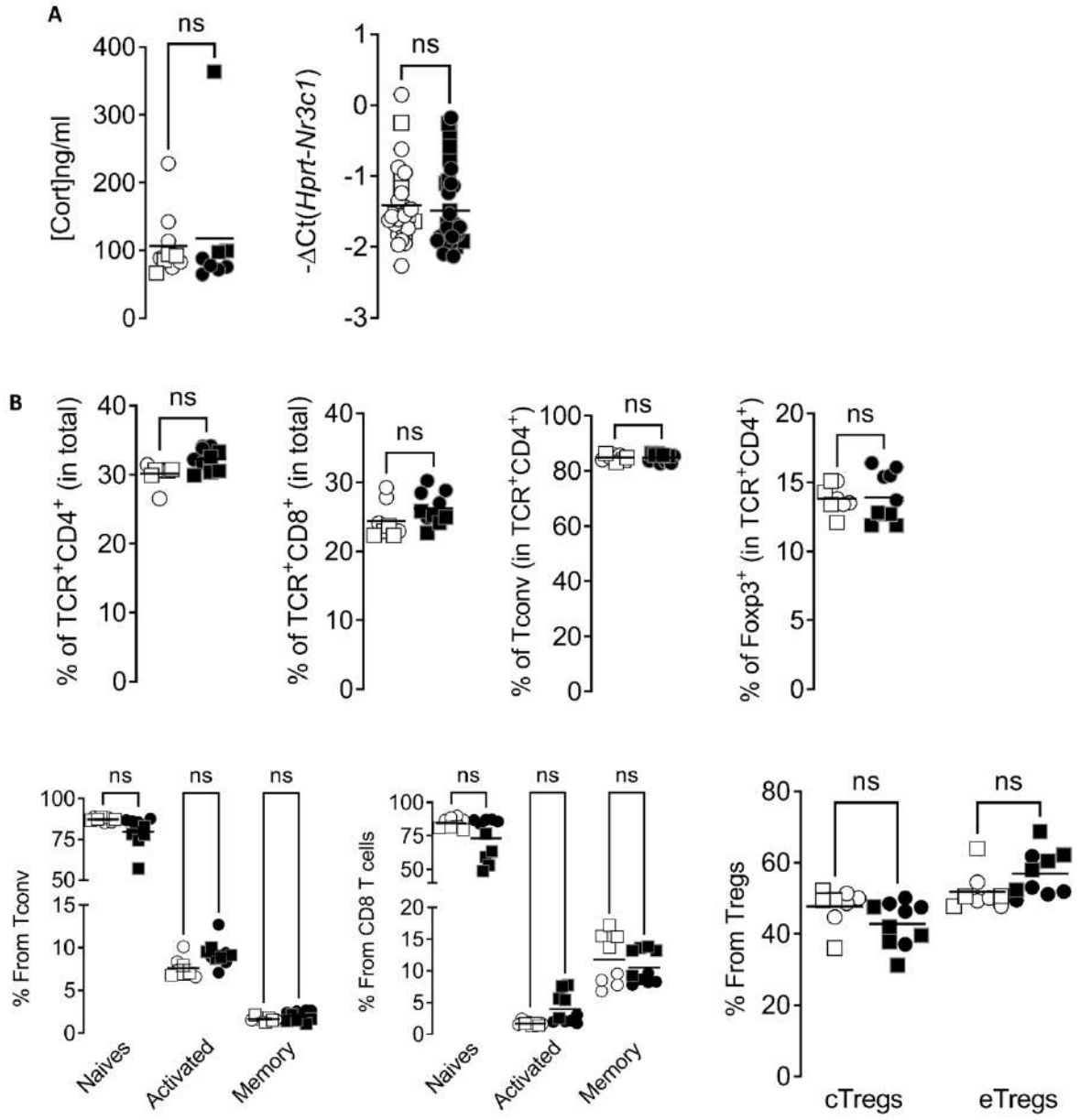


Figure S2: (A) Plasmatic corticosterone concentration and its receptor expression in the colon were determined in control mice (white) or PS mice (black), in the male (square) and female (circle) offspring. Data are expressed as scatter dot plot with the mean. ns: not significant. **(B)** 14 weeks old males (square) and females (circle) controls (while symbols, n=8) or prenatally stressed (black symbols, n=10) were euthanized and their mesenteric lymph node cells were analyzed by flow cytometry. The upper panel represent the proportion of the different major T cell populations in individual mice. The lower panel represent the activation status of T cell populations based on their expression of CD62L and CD44. Data are expressed as scatter dot plot with the mean. ns: not significant.

Supplementary references

[1] J. Boué *et al.*, « Endogenous regulation of visceral pain via production of opioids by colitogenic CD4(+) T cells in mice », *Gastroenterology*, vol. 146, n° 1, p. 166-175, janv. 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.020.

[2] P. Le Faouder *et al.*, « LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites », *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 932, p. 123-133, août 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.06.014.

[3] S. Nicolas *et al.*, « Transfer of dysbiotic gut microbiota has beneficial effects on host liver metabolism », *Mol. Syst. Biol.*, vol. 13, n° 3, p. 921, mars 2017, doi: 10.15252/msb.20167356.

[4] N. Segata *et al.*, « Metagenomic biomarker discovery and explanation », *Genome Biol.*, vol. 12, n° 6, p. R60, juin 2011, doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.

[5] M. G. I. Langille *et al.*, « Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences », *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, n° 9, p. 814-821, sept. 2013, doi: 10.1038/nbt.2676.

[6] O. Hammer, D. A. T. Harper, et P. D. Ryan, « PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis », p. 9.

[7] J. Pujo *et al.*, « Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis », *Gut*, 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2020-321173.

Discussion & Perspectives

Propriétés anti-inflammatoires d'un acide gras à longue chaîne bactérien dans la colite

Depuis 2011, l'utilisation d'EcN est recommandée dans le maintien des périodes de rémission de la rectocolite hémorragique, mais les mécanismes impliqués dans son activité probiotique restent à élucider [361]. En 2017, l'équipe a montré que cette bactérie produit du C12asnGABA, un lipopeptide aux effets analgésiques dont la synthèse dépendait de l'îlot pks [207]. Pour cette nouvelle étude, nous avons extrait les acides gras libres d'EcN et nous les avons analysés par spectrométrie de masse haute résolution couplée à de la chromatographie liquide. Sur les chromatogrammes, le pic correspondant au C12asnGABA produit par EcN était minoritaire par rapport à d'autres lipides détectés ***(Figure 69)***. Par interprétation des spectres de fragmentation, nous avons pu identifier que ces pics majoritaires correspondaient à des AGLC β-hydroxylés (hydroxylé en position 3). Nous avons émis l'hypothèse que ces molécules participaient aux effets d'EcN sur l'hôte. Nous avons comparé la production des AGLC β-hydroxylés par EcN à celle d'autres souches d'*E. coli B2,* pathogènes (NC101, NU14, UTI, CFT, SP15), commensale (M1/5), asymptomatique (ABU) et à une souche d'*E. coli* du groupe phylogénétique A (MG1655). Toutes ces souches bactériennes produisaient des concentrations différentes d'AGLC β-hydroxylés, mais EcN était caractérisée par une production significativement supérieure de C18-3OH par rapport aux autres souches. Nous avons donc émis l'hypothèse que le C18-3OH était en partie responsable des effets anti-inflammatoires d'EcN.

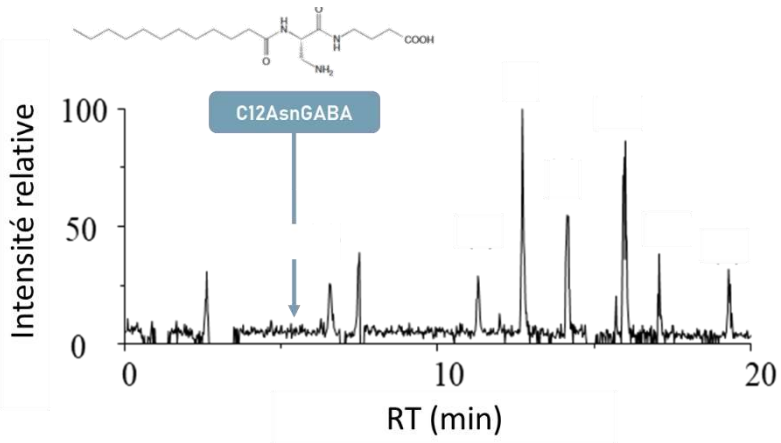


Figure 68 : Chromatogramme des AG libres d'EcN

Grâce à l'utilisation de mutants, nous avons démontré que, contrairement au C12asnGABA, la production du C18-3OH ne dépendait pas de l'îlot pks, et donc, que d'autres mécanismes sont impliqués dans sa synthèse. Dans la littérature, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation d'AGLC β-hydroxylés par les bactéries : la lyse à partir du lipide A ou à partir de l'acétyl-CoA, la formation par la β-oxydation ou la voie de la fatty acid synthase (FAS), ou encore via la voie des CYP152 [257]–[261]. Les CYP450 bactériennes impliquées dans des réactions d'oxydation des AGLC sont la CYP152B1 ou P450 SPα décrite chez *Sphingomonas paucimobilis* et la CYP152A1 ou P450 BSβ décrite chez *Bacillus subtilis*. Ces CYP450 se sont avérées actives dans l'hydroxylation dépendante de l'H_2O_2 des AGLC pour produire des acides gras α-hydroxylés (2-OH) et β-hydroxylés (3-OH) [407], [408]. En 2013, un orthologue de la CYP450 BSβ ayant 57% d'homologie en acides aminés, a été identifié dans *Clostridium acetobutylicum* (P450CLA, CYP152A2). Cette enzyme est également capable d'hydroxyler les AGLC en position a et b [409]. Pour l'instant, aucun homologue de ces CYP450 bactériennes n'a été décrit chez *E. coli.* Il serait donc intéressant de mener des études génétiques d'EcN pour évaluer si cette souche possède un homologue de ces enzymes, ce qui expliquerait sa synthèse d'AGLC b-hydroxylés. Comme chez *E. coli* le C18-3OH n'entre pas dans la composition du lipide A en condition basale, la lyse du lipide A ne paraît pas être la source principale de C18-3OH dans cette espèce [250], [251]. Des études génétiques ciblant la voie de la FAS et de la β-oxydation semble donc nécessaires pour comprendre l'origine du C18-3OH chez *E. coli.*

In vivo, dans un modèle de colite induite par le DSS, le C18-3OH possédait des effets anti-inflammatoires. Nous avons cherché à comprendre les mécanismes moléculaires qui étaient impliqués. Nous avons tout d'abord voulu évaluer la localisation du C18-3OH dans la paroi intestinale afin de déterminer sa cible cellulaire. Des études *in vitro, ex vivo* et *in vivo* ont mis en évidence que le C18-3OH entrait dans les cellules épithéliales intestinales (CEI), mais qu'il ne les traversait pas. Nous en avons donc déduit que son effet est localisé au niveau des CEI. Les AGLC possèdent deux mécanismes d'entrée au niveau du côlon : le flip-flop lipidique et le transport par CD36. *In vitro*, nous avons utilisé une lignée de CEI humaine, les Caco2, pour étudier son passage. Comme cette lignée n'exprime pas le CD36 mais que le C18-3OH entre dans ces cellules, ce transporteur ne semble pas être indispensable à son entrée dans les CEI. Suite au traitement par le C18-3OH, aucune augmentation de sa concentration n'était observée du côté basolatéral de l'épithélium *in vitro et ex vivo. In vivo,* sa concentration au niveau de la paroi du colon augmentait

2h après gavage avant de décroître sans être retrouvé dans le sang. Le C18-3OH semble donc être métabolisé par les CEI. Ce métabolisme pourrait avoir lieu au niveau de la β-oxydation mitochondriale où il peut servir de substrat à la 3-hydroxyacyl-Coenzyme A déshydrogénase. En effet, la production d'AGLC β-hydroxylés n'est pas restreinte aux bactéries, ils peuvent également être produits par les cellules eucaryotes lors de la β-oxydation mitochondriale. Une augmentation de la concentration en AGLC β-hydroxylés est observés dans les pathologies associées à des défauts de la β-oxydation mitochondriale comme l'acidose métabolique ou l'hyperammoniémie [410]. La quantification des AGLC-3OH utilisée classiquement pour détecter des contaminations bactériennes de l'environnement avec une extrême précision ne peut donc pas être utilisé au niveau de l'hôte [411].

Comme le C18-3OH s'accumule dans les CEI, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait interagir avec un récepteur nucléaire de la famille des PPAR. Parmi ces récepteurs, PPARγ possède comme agoniste des AGLC de 18 atomes de carbone : le 9-HODE, le 13-HODE et le 13-oxoODE [412]. L'activation de ce récepteur a été décrite pour ses propriétés anti-inflammatoires impliquant en partie l'inhibition de la voie NFκB. Différentes études ont montré que les effets d'EcN sur la colite sont associés à l'inhibition de cette voie importante dans le contrôle de l'immunité, ce qui renforce l'hypothèse que les effets probiotiques d'EcN sont liés à son interaction avec PPARγ [166]. Nous avons montré que le C18-3OH interagît avec le domaine agoniste PPARγ grâce aux expériences de TR-FRET. Néanmoins, ces expériences ne nous permettent pas de conclure que le C18-3OH est un agoniste de PPARγ. *In vivo,* le traitement de souris contrôles par un antagoniste de PPARγ, le GW9662, inhibait les effets du C18-3OH sur l'expression de gènes sous le contrôle transcriptionnel de PPARγ. Dans la colite, les antagonistes de PPARg augmentent l'intensité de l'inflammation [413] ce qui ne nous permet pas d'utiliser cette stratégie pour déterminer si les effets anti-inflammatoires du C18-3OH sont associés à l'activation de PPARγ. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'*in vivo*, l'activation de PPARγ ne soit pas le mécanisme d'action principal du C18-3OH dans la colite.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la production du C18-3OH par d'autres bactéries. Nous avons voulu déterminer s'il y existait une redondance fonctionnelle dans la synthèse de ce lipide. En clinique, une partie de la variabilité des effets des probiotiques peut s'expliquer par les différences d'implantation de ces bactéries. L'implantation de probiotiques

dépend en partie de ses interactions avec les communautés déjà établies dans le microbiote et les niches disponibles. Pour s'affranchir de ces effets, l'utilisation de prébiotiques favorisant les populations commensales bénéfiques a été étudiée dans la colite. Dans des modèles rongeurs de colite, le FOS présentait des effets anti-inflammatoires similaires à ceux retrouvés dans l'approche probiotique et étaient associés à des changements taxonomiques du microbiote intestinal [414]. Nous avons donc émis l'hypothèse que le FOS, en plus de modifier la composition du microbiote intestinal, modifie sa capacité fonctionnelle et plus particulièrement sa capacité à produire du C18-3OH. Dans le modèle de colite-DSS, le FOS augmentait la concentration de C18-3OH dans le côlon et modifiait la composition de microbiote intestinal en favorisant les genres *Allobaculum, Parabacteroides, Holdemanella et Akkermansia.* Les trois derniers, dont *Holdemanella* était le plus abondant, étaient positivement corrélés à la concentration de C18-3OH. *In vitro*, nous avons quantifié la production de C18-3OH dans l'unique représentante du genre *Holdemanella* : *H. biformis.* Il est important de noter qu'à l'inverse des acides gras à courtes chaines, la production de C18-3OH est indépendante du FOS. C'est-à-dire que le FOS favorise l'augmentation de l'abondance d'*Holdemanella* mais n'est pas métabolisé directement en C18-3OH. La souche *H. biformis* n'a jamais été étudiée comme probiotique dans la diminution de la colite, mais sa capacité de production de C18-3OH supérieure à celle d'EcN pourrait en faire un probiotique intéressant. De futures études cliniques l'utilisant permettraient d'étudier sa capacité à augmenter la durée des phases de rémission. La production de C18-3OH n'est donc pas spécifique aux *Escherichia coli* et, au laboratoire, lors d'études menées sur d'autres genres bactériens nous avons montré que cet AGLC β-hydroxylé peut aussi être produit par *Lactobacillus murinus* ***(Figure 69)***. Ce lipide peut donc être produit par des bactéries gram+ ou gram-. Ces résultats montrent qu'il existe une redondance fonctionnelle pour la production des AGLC β-hydroxylés au sein du microbiote intestinal.

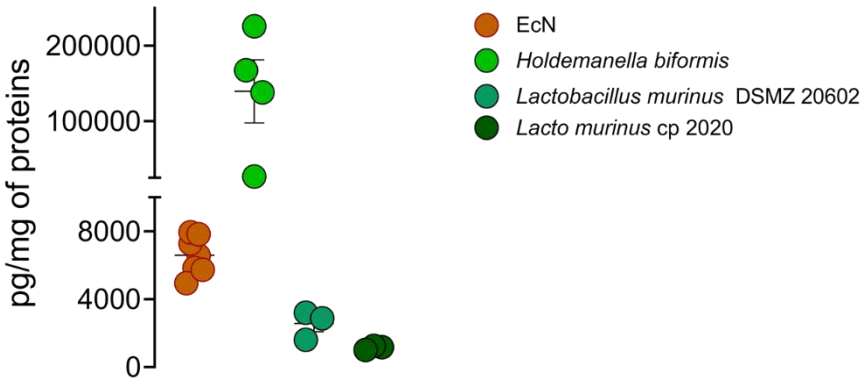


Figure 69 : Quantification de la production de C18-3OH dans différentes bactéries

Quantification du C18-3OH dans les culots de EcN, H. biformis, L. murinus DSMZ20602 et L. murinus IRSD_2020 par spectrométrie de masse.

En 2020, *H. biformis* et l'activation de PPARγ ont tous les deux été identifiés comme bénéfiques dans l'amélioration de la sévérité d'un modèle de cancer colo-rectal [170]. Dans ce modèle de cancer colo-rectal, Zagato *et al*. ont montré que le surnageant d'*H. biformis* diminuait la croissance tumorale, *in vivo,* par une action d'inhibiteur de la HDAC. Ils ont montré que ces effets étaient en partie médiés par les AGCCs produits par *H. biformis*, mais ces résultats ouvrent la possibilité que le C18-3OH puissent intervenir dans cette communication et avoir une action anti-tumorale. De plus, le même effet était observé avec les surnageants de *Lactococcus lactis,* à savoir qu'il existe dans ce modèle également, une redondance fonctionnelle du microbiote intestinal.

Douleur viscérale induite par le stress prénatal : rôle des lipopeptides bactériens

L'étude préclinique menée par Bradford *et al.* en 2012 [324], a montré qu'il existe un lien entre la survenue d'évènements néfastes pendant la période utérine et la petite enfance et l'incidence du SII à l'âge adulte. D'autres études ont montré que le stress gestationnel favorise l'apparition de troubles psychologiques comme l'anxiété et la dépression [342], [346], [347], deux comorbidités majeures du SII. Cependant, les biais de mémoire et la difficulté de suivre les personnes sur plusieurs années compliquent la réalisation d'études cliniques permettant d'établir des liens de causalité entre le stress gestationnel et l'apparition de troubles fonctionnels digestifs dans la descendance adulte.

Pour étudier cette problématique, nous avons utilisé un modèle de stress prénatal (SP) en fin de gestation utilisé classiquement pour étudier l'incidence de l'anxiété et de la dépression dans la descendance [326], [339]. Au niveau intestinal, la descendance SP présentait les caractéristiques classiques du SII : une hypersensibilité viscérale à la distension colorectale, pas d'inflammation visible du côlon et une dysbiose du microbiote intestinal, chez les mâles comme chez les femelles. Suite à un stress prénatal chez le rat, la descendance adulte présente également une augmentation de la sensibilité viscérale sans augmentation de la perméabilité [343]. Dans notre modèle, la dysbiose du microbiote intestinal était caractérisée par une augmentation de l'abondance de *Clostridium clostridioforme* et une diminution de l'abondance de *Lactobacillus murinus/animalis* de façon similaire dans les deux sexes. *Clostridium clostridioforme* a été reclassifié comme étant *Enterocloster clostridioformis* en 2019 [371] et est souvent considéré comme un groupe avec *Clostridium boltae et Clostridium hathewayi*. Ces trois espèces sont difficilement différenciables les unes des autres à cause de leur grande proximité génétique. Peu d'études se sont portées sur leur rôle dans la relation entre le microbiote intestinal et son hôte. Chez les enfants atteints de troubles du spectre autistique, l'abondance de ces bactéries est augmentée au sein de leur microbiote intestinal [372], [374]. Sans faire de lien avec le microbiote, des études précliniques et cliniques ont établi le lien entre le stress prénatal et une augmentation des troubles du spectre autistique dans la descendance [341], [351], [377]. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour comprendre s'il y a un lien de causalité entre le SP, *C. clostridioforme* et cette pathologie, et les mécanismes sous-jacents.

Nos résultats sont en accord avec la littérature existante où dans différents modèles rongeurs, le SP entraîne une altération du microbiote intestinal caractérisée par une diminution des *Lactobacillus* [344], [345]. Il semblerait que la diminution des *Lactobacillus* soit une réponse universelle au stress chronique puisqu'elle a été retrouvée dans différents modèles de stress et dans différentes espèces. Chez l'homme aussi, les études s'intéressant à l'impact du stress gestationnel sur le microbiote de la descendance ont montré que les nourrissons de mères stressées ont une abondance plus faible de *Lactobacillus* dans leur fèces. En revanche, la persistance de cette diminution au cours de la vie chez l'homme et la façon dont le stress chronique impacte ces populations reste à établir.

Comme l'abondance de *L. murinus* IRSD_2020 (souche isolée dans les souris contrôle) était inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale des souris, nous avons émis l'hypothèse que cette bactérie produit un métabolite analgésique similaire au C12AsnGABA, un lipopeptide trouvé en 2017 par l'équipe chez EcN [207]. En condition normale de culture, *L. murinus* n'était pas capable de produire des lipopeptides contenant du GABA. Nous avons donc réalisé des cultures de cette bactérie enrichie en GABA. Dans ces conditions et après analyse par spectrométrie de masse, nous avons montré que cette bactérie produit aussi des lipopeptides liés au GABA : le C14AsnGABA, le C16PheGABA, le C12AsnGABA, le C16GluGABA, le C12IleGABA, le C14IleGABA et le C12AlaGABA. Cette expérience a été réalisée deux fois avec pour chaque répliqua des clones différents, nous avons donc quantifié ces lipopeptides dans 10 clones différents de *L. murinus* IRSD_2020. Nous avons constaté que tous les clones produisent des lipopeptides GABA mais à des concentrations différentes. Par exemple, lors de la première série d'expérience, la plupart des clones produisait de fortes concentrations de C12AsnGABA alors que lors de la seconde expérience c'étaient le C12IleGABA et le C14IleGABA qui étaient majoritairement produits. Il semblerait donc qu'en fonction des clones étudiés, l'acide aminé situé entre l'acide gras et le GABA le plus souvent retrouvé soit différent. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de culture ou de sélection des clones pouvant expliquer cette différence. La quantité totale des lipopeptides-GABA produit par chaque clone était équivalente. *In vivo*, la quantité de C12AsnGABA et de C14AsnGABA était significativement diminuée dans le côlon des souris SP par rapport aux souris contrôles. Ces résultats montrent que la production de lipopeptides liés au GABA est redondante au niveau du microbiote intestinal et que le SP, en plus d'impacter la composition bactérienne du microbiote, elle altère ses capacités métaboliques.

La production de GABA a déjà été décrite dans plusieurs espèces de *Lactobacillus* comme *L. brevis, L. casei, L. paracasei, L. rhamnosus, and L. delbrueckii* [379]. Il est synthétisé par une glutamate décarboxylase (GADB) à partir du glutamate importé par une antiport glutamate/GABA (GADC) [380]. Une étude génétique de la souche *L. murinus IRSD_2020* isolée dans le côlon de nos souris a montré qu'elle ne possède pas les enzymes nécessaires à la production de GABA. En revanche, dans un milieu enrichi en GABA, elle possède les voies métaboliques nécessaires pour l'associer à un acide gras et à un acide aminé. Sa source de GABA doit donc être externe. *In vivo,* le GABA qui lui est apporté pourrait provenir de deux autres espèces de *Lactobacillus* également retrouvées dans le côlon de nos souris : *L. reuteri* et le cluster *L. taiwanensis/johnsonii/gasseri* qui produisent tous les deux du GABA [179]. Comme pour les trois *Clostridium* et pour *L. murinus et L. animalis,* ces trois espèces sont difficilement différenciables les unes des autres à cause de leur proximité génétique [381]. *L. reuteri* et le cluster *L. taiwanensis/johnsonii/gasseri* forment des biofilms bi-espèces dans l'intestin et favorisent mutuellement leur implantation [111]. De plus elles sont fréquemment retrouvées regroupées avec *L. murinus*, ce qui favoriserait les échanges de métabolites entre ces espèces. Dans une étude préliminaire, Nous avons co-cultivé *L. murinus* IRSD_2020 et *L. reuteri* en présence de glutamate. Dans ces conditions de culture, nous avons pu quantifier des lipopeptides-GABA mettant ainsi en évidence une coopération métabolique entre ces deux souches de bactérie.

In vivo, nous avons testé l'effet d'un lipopeptide-GABA sur l'hypersensibilité viscérale induite par le stress prénatal. Comme nos expériences *in vitro* ont démontré que l'acide animé situé entre l'acide gras et le GABA était différent en fonction des clones, nous avons décidé d'utiliser le C14AsnGABA. Pour cela nous avons administré le lipopeptide en intra-colique avant de mesurer la réponse viscéro-motrice à la distension colorectale des souris SP. Le traitement par le C14AsnGABA restaurait une normo-sensibilité chez les souris SP.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes liant le stress prénatal et la dysbiose du microbiote intestinal à l'âge adulte, nous avons tenté de déterminer quand cette dysbiose caractérisée par cette diminution de l'abondance en *L. murinus* se mettait en place. Chez la majorité des femmes mais pas chez la souris, les L*actobacillus* sont le genre dominant du microbiote vaginal [415]. Pendant l'enfance, la population de *Lactobacillus* est peu présente au niveau de la flore vaginale. Son abondance augmente au moment de la puberté au cours de

laquelle l'augmentation d'œstrogènes entraîne l'augmentation de glycogène produit par les cellules épithéliales vaginales. En desquamant, ces cellules libèrent le glycogène qui est métabolisé en lactate par les *Lactobacillus*. Ainsi, la puberté favorise l'établissement de la population de *Lactobacillus* au niveau du microbiote vaginal jusqu'à la ménopause où les taux d'œstrogènes diminuent ***(Figure70).*** En situation de stress chronique, le cortisol diminue la production d'œstrogènes [416], [417] diminuant ainsi le glycogène épithélial et donc l'abondance de la population vaginale de *Lactobacillus.*

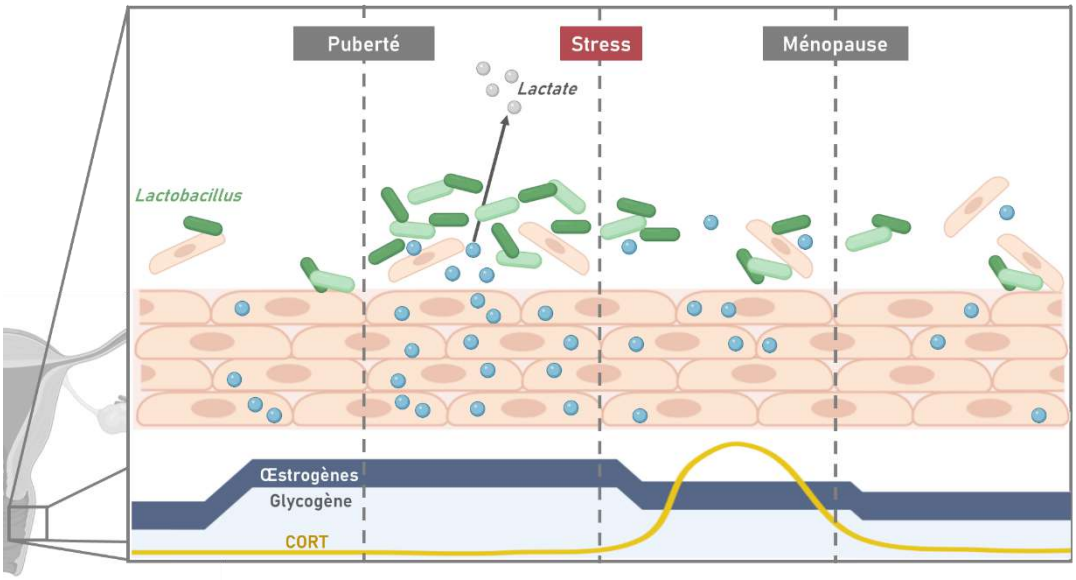


Figure 70 : Variations du microbiote vaginal humain

L. animalis/murinus n'est pas une des espèces majoritaires de *Lactobacillus* retrouvées au niveau du vagin. En 2017, Jašarević *et al*. [354] ont mesuré l'impact du stress gestationnel sur le microbiote vaginal des mères et ont observé une diminution de l'abondance du genre *Lactobacillus* pendant la grossesse et jusqu'au 2ème jour postnatal **(*Figure 71)***. Ces résultats nous ont mené à l'hypothèse que dans notre modèle, le stress chronique entraînerait une dysbiose du microbiote vaginal de la mère ce qui altèrerait la composition du microbiote transmis aux souriceaux à la naissance. Nous avons donc essayé de quantifier *L. murinus IRSD_2020,* par PCR-TaqMan, dans le vagin et dans le fluide vaginal des souris gestante au 18ème jour de gestation avant la mise-bas. Nous avons réussi à extraire de l'ADN dans les deux types d'échantillons mais nous n'avons pas pu quantifier la présence de *L. murinus IRSD_2020.* Un séquençage de l'ARN 16S du fluide vaginal, comme réalisé par Jašarević *et al*., pourrait nous permettre de quantifier la présence de cette espèce dans le microbiote vaginal.

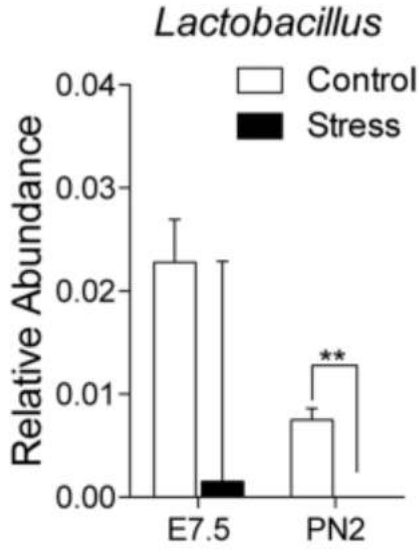


Figure 71 : Quantification de L. murinus dans les vagins de mères stressées

Jašarević *et al.* 2017 [354]

Quantification de l'abondance relative du genre Lactobacillus dans le fluide vaginal de mères contrôles ou stressées (souris) par séquençage de l'ARN 16S.

Comme notre méthode ne nous permettait pas de quantifier *L. murinus* dans la flore vaginale, nous avons mesuré la quantité de *L. murinus IRSD_2020* dans les fèces de la descendance avant le sevrage pour savoir si cette différence est observée depuis le début de la vie. Contrairement à ce que nous avions retrouvé chez les adultes, la quantité de *L. murinus* IRSD_2020 était supérieure dans les fèces des souris SP par rapport aux souris contrôles **(Figure 72)**.

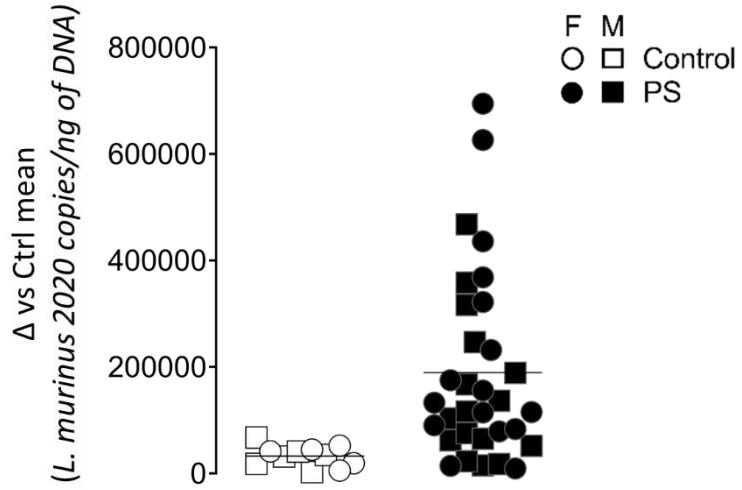


Figure 72 : Quantification de *L. murinus IRSD_2020 dans les côlons de souriceaux*

Quantification de L.murninus IRSD_2020 dans les fèces de souriceaux âgés de trois semaines par Taqman-PCR. Les résultats sont représentés en delta versus la moyenne des contrôles.

En 2018, Jašarević *et al.* ont réalisé un modèle de stress prénatal durant la première moitié de la gestation, ont fait naître les souriceaux par césarienne, puis les ont colonisés avec du fluide vaginal de mères stressées ou contrôles afin de pouvoir différencier les effets directs du stress sur l'hôte (souriceaux issus de mère stressée + microbiote vaginal de mère contrôle) des effets liés au microbiote (souriceaux issus de mère contrôle + microbiote vaginal de mère stressée) **(*Figure 73)*** [345]. Enfin les souriceaux ont été confiés à des mères adoptives sans considération de leur sexe ou de leur groupe.

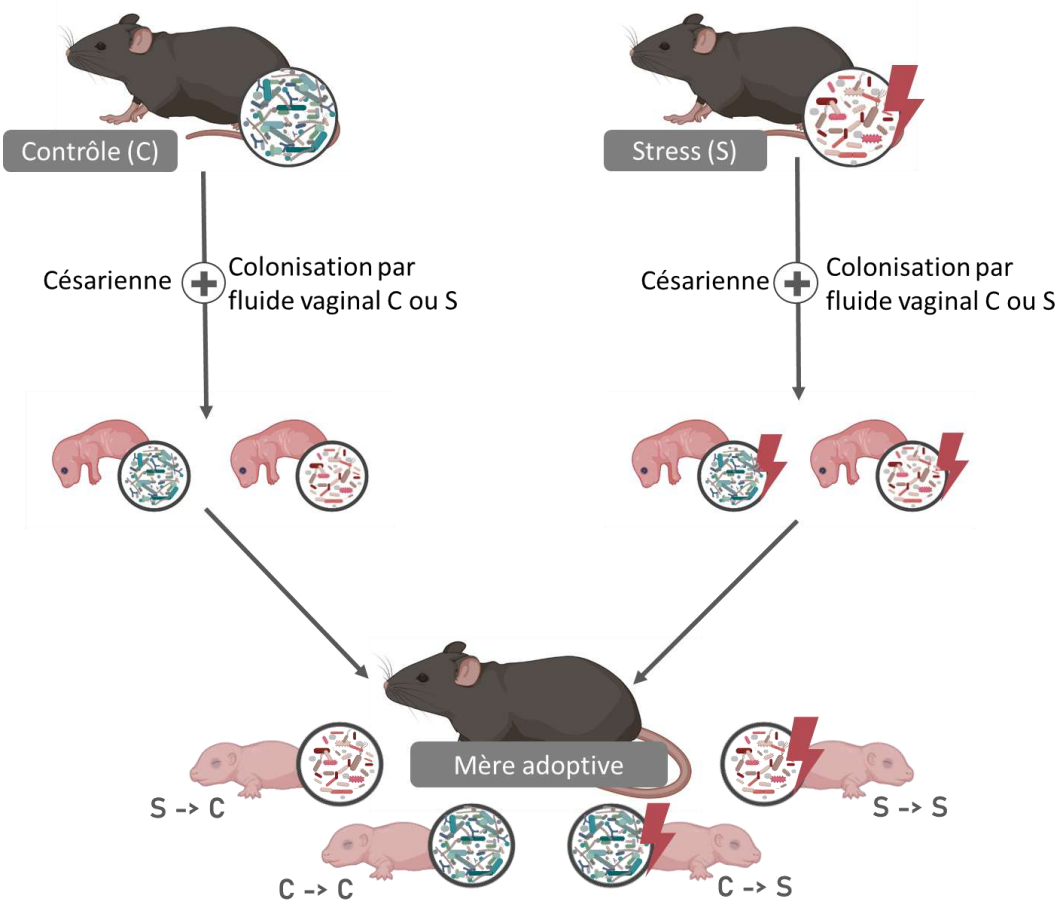


Figure 73 : Plan expérimental de Jašarević et al. 2018

[345]

Dans cette expérience, au 2ème jour postnatal, les souriceaux issus de mère stressée et ayant reçu un microbiote vaginal de mère stressée avaient une abondance diminuée de *L. murinus* ASF361 au niveau du côlon distal ***(Figure 74).*** A l'inverse, des souriceaux issus de mère stressée et colonisés avec du microbiote vaginal de mère contrôle ou des souriceaux issus de mère contrôle et colonisés avec du microbiote vaginal de mère stressée ne présentaient aucune variation significative de l'abondance de *L. murinus* par rapport au groupe contrôle (souriceaux issus de mère contrôle + microbiote vaginal de mère contrôle). Ce résultat montre que l'effet du stress prénatal sur le microbiote vaginal de la mère seul ou sur le développement embryonnaire seul n'est pas suffisant pour altérer l'établissement des *Lactobacillus* dans le microbiote intestinal de la descendance. La cumulation des effets était nécessaire pour voir apparaître ce phénotype. Des études complémentaires seront importantes pour comprendre les facteurs impliqués dans l'implantation des souches de *Lactobacillus.* Cependant, ils n'ont pas étudié la chronicité de cette altération. Nos résultats ont été obtenus 3 semaines après la naissance des souriceaux. A ce stade, le microbiote transmis vaginalement a déjà été supplanté par le microbiote apporté et/ou modulé par le lait maternel. Nous ne pouvons donc pas conclure sur le défaut de transmission vertical du microbiote vaginal dans notre modèle. Contrairement à notre étude, Jašarević ***et al.*** s'affranchissent à la fois des variations de comportement maternel et des variations de compositions bactériennes et métaboliques du lait maternel, puisque tous les souriceaux sont élevés par des mères adoptives. Dans notre modèle, les souriceaux restent avec leurs mères biologiques jusqu'au sevrage. Or, le stress gestationnel entraîne une modification des comportements maternels et pourrait impacter la composition du lait maternel qui influe fortement sur l'établissement du microbiote [121], [309], [353].

La composition du lait maternel et la réaction de sevrage, qui sont importantes pour la bonne mise en place du microbiote, pourraient également être impactées par le stress prénatal et expliquer les différences que nous observons avant et après sevrage. Nous n'avons pas exploré ces mécanismes dans notre étude mais des études récentes s'y sont intéressées. Par exemple, concernant l'impact sur la composition du lait maternel, *Brawner et al.* [418] ont montré en 2020 que le SP n'altérait pas la quantité d'IgA dans le lait contenu dans l'estomac des souriceaux utilisé comme proxy pour la quantité dans le lait maternel. En revanche, le SP augmentait la quantité d'IgA liés à des bactéries dans les fèces des souriceaux femelles [418]. Chez l'homme, les résultats sont moins clairs et les associations entre stress maternel et quantité d'IgA dans le lait varient en

fonction des paramètres utilisés pour quantifier le stress. Les IgA sont importants dans l'homéostasie hôte-microbiote mais aussi dans la sélection des bactéries et une modification du répertoire bactérien qu'ils reconnaissent pourrait impacter la composition du microbiote. Au cours de la réaction de sevrage, une altération de la mise en place des cellules immunitaires pendant la période utérine ou la modification de l'expression génique et épigénétique de ces cellules pourraient aussi impacter la mise en place d'un microbiote fonctionnel à l'âge adulte.

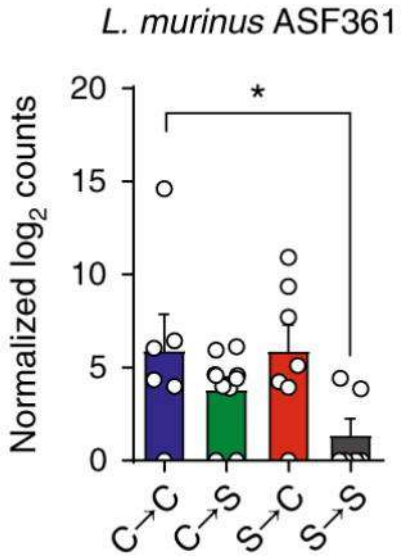


Figure 74 : Quantification de L. murinus ASF361 dans les côlons de souriceaux

Jašarević et al. 2018 [345]

Quantification de l'abondance relative de L. murinus ASF361 dans les côlons de souriceaux âgés de 2 jours par séquençage de l'ARN 16S.

Conclusion et perspectives

Les deux études menées durant ma thèse ont permis d'identifier de nouveaux mécanismes de communication entre l'hôte et le microbiote pour permettre le maintien de l'homéostasie intestinale. Le développement de ces stratégies probiotiques (EcN, *H. biformis, L. murinus IRSD_2020),* symbiotiques par l'association d'une de ces bactéries à un prébiotique ou postbiotiques (C18-3OH et lipopeptides liés au GABA) pourrait représenter de nouvelles opportunités pour restaurer et maintenir l'homéostasie intestinale. Des études complémentaires permettraient d'étudier les effets de ces molécules sur d'autres systèmes comme le système immunitaire, sur la composition du microbiote intestinal ou pour élargir ces résultats vers d'autres pathologies comme le cancer colorectal. Enfin, nous pouvons supposer que les autres AGLC β-hydroxylés identifiés ainsi que les lipopeptides contenant d'autres acides aminés et neurotransmetteurs sont aussi impliqués dans la régulation de la physiopathologie de l'hôte.

Ces résultats, associés à ceux précédemment obtenus par l'équipe placent le microbiote intestinal et sa redondance comme acteurs majeurs de la régulation et du maintien de l'homéostasie intestinale. Ils ouvrent de nouveaux axes de recherche dans la compréhension de la communication hôte-microbiote et à de nouvelles pistes thérapeutiques.

Annexes

Annexe 1 : Curriculum Vitae

Annexe 2 : Publications issues de travaux collaboratifs

Pendant ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de participer à plusieurs projets collaboratifs dont trois ont été publiés :

Publication 1 : House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation

Ces travaux portent sur l'implication de clusters neuro-immuns dans le développement d'allergies cutanées comme la dermatite atopique. Ce papier démontre que les neurones sensitifs TRPV1$^+$ sont activés par les antigènes impliqués dans la dermatite atopique. Ces neurones activés libèrent de la substance P qui active les mastocytes proches des nocicepteurs via le récepteur MRGPRB2. Enfin, grâce à plusieurs modèles de souris KO, cette étude a montré la nécessité de la substance P, des mastocytes et du récepteur MRGPRB2 dans le développement de la dermatite atopique *in vivo.*

Publication 2 : Analgesic effects of topical amitriptyline in patients with chemotherapy- induced peripheral neuropathy: mechanistic insights from studies in mice

Cette étude a permis d'évaluer l'efficacité potentielle de l'amitriptyline sous forme d'application topique dans la diminution des douleurs neuropathiques induites par la chimiothérapie. Les résultats montrent qu'un traitement local contenant 10% d'amitriptyline permet de diminuer les douleurs chez 25 patients sans engendrer les effets secondaires habituellement observés lors d'un traitement oral. En préclinique, l'application d'amitriptyline sur les pattes des souris diminuait la sensibilité mécanique somatique. Au niveau des neurones sensitifs, l'amitriptyline inhibe l'activation des récepteurs Nav1.7, Nav1.8 et Nav1.9, mais active le canal TRPA1.

Publication 3 : Peripheral opioid receptor blockade enhances epithelial damage in piroxicam-accelerated colitis in IL-10-deficient mice

Cette étude s'est intéressée au rôle des opioïdes endogènes dans la colite. Les auteurs ont pu démontrer que lors de la colite, le blocage des récepteurs périphériques aux opioïdes n'avait pas

d’effet sur la sévérité de la colite mais aggravait l’apoptose des cellules épithéliales intestinales et l’augmentation de perméabilité paracellulaire induite par la colite. Ces résultats montrent que le tonus basal endogène d’opioïdes, bien qu’il ne soit pas suffisant pour réduire la sévérité de la colite, est important dans la protection de l’intégrité physique de la barrière épithéliale intestinale.

Camille PETITFILS, PhD student

Date of birth: 28/12/94 | French | camille.petitfils@inserm.fr | +33(0)531547917

Diplomas

- **2020: Certification for the use and care of lab animals** – Federation of European laboratory animal science associations. (A+B+C+D modules)
- **2018: M. Sc. of digestive health and nutrition** – Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France
- **2016: B. Sc. of cellular biology and physiology** – Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, France

Experiences

- **Oct-2018 – Present: PhD "Lipid metabolites produced by the gut microbiota: from visceral hypersensitivity to therapy for the irritable bowel syndrome"**
  Digestive health research institute INSERM, Toulouse, France
  Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases I2MC, INSERM, Toulouse, France
  Supervisors: Nicolas Cenac (nicolas.cenac@inserm.fr) [IRSD] & Pauline LeFaouder (pauline.lefaouder@inserm.fr) [I2MC]

  Jan-2018 – June-2018: Master degree internship "Lipid communication between the gut microbiota and the host and its involvement in visceral pain"
  Digestive health research institute INSERM, Toulouse, France
  Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases I2MC, INSERM, Toulouse, France
  Supervisors: Nicolas Cenac (nicolas.cenac@inserm.fr) [IRSD] & Pauline LeFaouder (pauline.lefaouder@inserm.fr) [I2MC]

- **Jan-2017 – March-2017: Master degree internship "Characterisation of the biological effect of the bacterial C18-3OH on the host gut homeostasis"**
  Digestive health research institute INSERM, Toulouse, France
  Supervisor: Nicolas Cenac (nicolas.cenac@inserm.fr) [IRSD]

Awards & fellowships

- **2021** French group of Neurogastroenterology, Best oral communication
- **2020** French society for the study and the treatment of pain, Jury's prize for posters
- **2019** French pain research network, Best oral communication
- **2019** French group of Neurogastroenterology, Best oral communication
- **2019** United European Gastroenterology week, Best oral communication
- **2019** United European Gastroenterology week, Travel Grant
- **2018-2021** French ministerial grant for PhD research

Societies

- Member of the French neurogastroenterology association (GFNG)
- Member of the Australian NeuroGastroenterology & motility Association Inc (ANGMA)

Lay public communication

- **Opération Déclics,** communication in high schools
- **Atelier Projet Explorer** communication in junior high schools and high schools
- **Tutored internship** for B. Sc. students
- **Reviewer for « Papier-mâché »** a lay public scientific website

- **Le comptoire des science** communication to high school students

Scientific communications

Papers

- **2021:**

  Hueber A, **Petitfils C,** Le Faouder P, Langevin G, Galano Jm, Martin Jf, Tabet Jc, Cenac N, Bertrand J.
  Discovery and quantification of lipoamino acids in bacteria. Accepted in Analytica Chimica Acta.

  Leveque E, Joulia R, **Petitfils C**, Mas-Orea X, Payros G, Laurent C, Gaudenzio N, Dietrich G, Valitutti S, Cenac N, Espinosa E.
  T helper cell-licensed mast cells promote inflammatory Th17 cells. Submitted to Nature communication.

  Mas-Orea X, Sebert M, Benamar M, **Petitfils C**, Blanpied C, Saoudi A, Deraison C, Barreau F, Cenac N, and Dietrich G.
  Colitis-induced epithelial damage is locally modulated by endogenous opioids in IL-10-deficient mice. *International journal of molecular science*, 2021. *10.3390/ijms22147387*

- **2020:**
  Genevois A-L, Ruel J, Penalba V, Hatton S, **Petitfils C**, Ducrocq M, Principe P, Dietrich G, Greco C, Delmas P.
  Analgesic Effects of Topical Amitriptyline in Patients With Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Mechanistic Insights From Studies in Mice. *J. Pain*. Nov 2020.
  DOI: 10.1016/j.jpain.2020.11.002

  Pujo J*, **Petitfils C*,** Le Faouder P, Eeckhaut V, Payros G, Maurel S, Perez-Berezo T, Van Hul M, Barreau F, Blanpied C, Chavanas S, Van Immerseel F, Bertrand-Michel J, Oswald E, Knauf C, Dietrich G, Cani P.D, Cenac N.
  Anti-inflammatory properties of a bacterial long chain fatty acid. *Gut*, Sept **2020 (*joint first authors).**
  DOI: 10.1136/gutjnl-2020-321173

- **2019:**
  Serhan N*, Basso L*, Sibilano R, **Petitfils C**, Meixiong J, Bonnart C, Reber LL, Marichal T, Starkl P, Cenac N, Dong X, Tsai M, Galli SJ, Gaudenzio N.
  House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation. *Nature Immunology*. Nov 2019. (*joint first authors). *DOI: 10.1038/s41590-019-0493-z*

Oral communications

- **2021:**

  French neurogastroenterology association (GFNG), Rennes, France
  "Impact of prenatal stress on visceral sensitivity and intestinal homeostasis in adulthood"

- **2020:**
  16th National symposium of the french pain research Bordeaux, France
  "Prenatal stress predisposes to irritable bowel syndrome in adulthood"

United European Gastroenterology week (UEGW)
"Impact of prenatal stress on visceral sensitivity and intestinal homeostasis in adulthood."
This abstract has been selected to be published in EMJ Gastroenterology
EMJ Gastroenterol. 2020;9[1]:48-50. Abstract Review No. AR3

French society for the study and the treatment of pain (SFETD) –selected oral presentation amongst jury's prize posters "Impact of prenatal stress on visceral sensitivity and intestinal homeostasis in adulthood."

- **2019:**

15th National symposium of the french pain research network, Paris, France. "Bacteria induce the release of proalgesic lipids by epithelial cells"

French neurogastroenterology association (GFNG), Toulouse, France
"Bacteria induce the release of proalgesic lipids by epithelial cells"

United European Gastroenterology week (UEGW), Barcelona, Espagne
"Bacteria induce the release of proalgesic lipids by epithelial cells"

Invited speaker, French society for the study and the treatment of pain (SFETD) (SFETD), Strasbourg, France
"Functional characterization of the gut microbiota and its relevance in gut microbiota homeostasis"

International schools

MINDinGUT spring/summer school, 2021

European pain school, Sienne, Italie, 2020
Oral presentation : "Impact of prenatal stress on visceral sensitivity and intestinal homeostasis in adulthood"

Toulouse School of Lipids, 2020

Posters

- **2021:**

United European Gastroenterology week (UEGW),
"Impact of prenatal stress on visceral sensitivity and intestinal homeostasis in adulthood"

European Society of Neurogastroenterology and Motility
"Impact of prenatal stress on visceral sensitivity and intestinal homeostasis in adulthood"

4th Meeting of the Federation of Neurogastroenterology & Motility (FNM), Adelaïde, Australie
"Anti-inflammatory properties of a bacterial long chain fatty acid"

4th Meeting of the Federation of Neurogastroenterology & Motility (FNM), Adelaïde, Australie
"Impact of prenatal stress on visceral sensitivity and intestinal homeostasis in adulthood"

- **2020:**
  French society for the study and the treatment of pain (SFETD) – Jury's prize poster
  "Impact du stress prénatal sur la sensibilité viscérale et l'homéostasie intestinale à l'âge adulte."

- **2019:**
  United European Gastroenterology week (UEGW), Barcelona, Espagne
  "Characterization of a new bacterial ligand for PPARγ"

Europe PMC Funders Group
Author Manuscript
Nat Immunol. Author manuscript; available in PMC 2020 April 07.

Published in final edited form as:
Nat Immunol. 2019 November ; 20(11): 1435–1443. doi:10.1038/s41590-019-0493-z.

House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation

Nadine Serhan[1,#], **Lilian Basso**[1,#], **Riccardo Sibilano**[2,3], **Camille Petitfils**[4], **James Meixiong**[5], **Chrystelle Bonnart**[4], **Laurent L. Reber**[6,7], **Thomas Marichal**[8,9], **Philipp Starkl**[10,11], **Nicolas Cenac**[4], **Xinzhong Dong**[5,12], **Mindy Tsai**[2,3], **Stephen J. Galli**[2,3,13,#], **Nicolas Gaudenzio**[1,#]

[1]Unité de Différenciation Epithéliale et Autoimmunité Rhumatoïde (UDEAR), UMR 1056, INSERM, Université de Toulouse, Toulouse, France

[2]Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA

[3]Sean N. Parker Center for Allergy and Asthma Research, Stanford University School of Medicine, CA 94305, USA

[4]IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, INP-ENVT, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France

[5]The Solomon H. Snyder Department of Neuroscience, Center for Sensory Biology Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

[6]Department of Immunology, Unit of Antibodies in Therapy and Pathology, Institut Pasteur, Paris, France; INSERM, U1222, Paris, France

[7]Center for Pathophysiology Toulouse Purpan, INSERM U1043, CNRS UMR 5282, Toulouse III University, Toulouse, France

[8]GIGA Institute and Faculty of Veterinary Medicine, Liege University, Liege, Belgium

[9]WELBIO, Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology, Wallonia, Belgium

[10]CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences

Users may view, print, copy, and download text and data-mine the content in such documents, for the purposes of academic research, subject always to the full Conditions of use:http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms

Correspondence should be addressed to: Nicolas Gaudenzio, Immception Lab (www.immception.com), UDEAR, UMR 1056 Inserm - Université de Toulouse, Hôpital Purpan, Place du Dr Baylac - TSA 40031, 31059 Toulouse cedex 9 – France, Tel: +33 (0)561158426, nicolas.gaudenzio@inserm.fr or Stephen J. Galli, 269 Campus Drive, CCSR Room 3255b, Stanford, CA 94305-5176, USA, Telephone: (650) 736-6014, sgalli@stanford.edu.
[#]The following authors contributed equally

Life Sciences Reporting Summary. Further information on experimental design and reagents is available in the Life Sciences Reporting Summary.

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author Nicolas Gaudenzio upon request.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Author contributions
SJG and NG conceived the project. All authors were involved in experimental design. NS, LB and NG performed most experiments and compiled the data. RS, CB, JM, CP, TM, PS, LLR, NC, XD and MT helped with experiments. All authors participated in analyzing the data and writing or editing the paper.

Europe PMC Funders Author Manuscripts
Europe PMC Funders Author Manuscripts

[11]Laboratory of Infection Biology, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, 1090, Vienna, Austria

[12]Howard Hughes Medical Institute, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

[13]Department of Microbiology & Immunology Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Abstract

Allergic skin diseases, such as atopic dermatitis (AD), are clinically characterized by severe itching and type 2 immunity-associated hypersensitivity to widely-distributed allergens, including those derived from house dust mites (HDMs). Here we found that HDMs with cysteine-protease activity directly activated peptidergic nociceptors, which are neuropeptide-producing nociceptive sensory neurons, that expressed the ion channel TRPV1 and *Tac1*, the gene encoding the precursor for the neuropeptide substance P. Intravital imaging and genetic approaches indicated that HDMs-activated nociceptors drove the development of allergic skin inflammation by inducing the degranulation of mast cells contiguous to such nociceptors through the release of substance P and the activation of the cationic molecules receptor MRGPRB2 on mast cells. This data indicates that, after exposure to HDM allergens, activation of TRPV1^{+}*Tac1*$^{+}$ nociceptor-MRGPRB2^{+} sensory clusters represents a key early event in the development of allergic skin reaction.

Altered tissue sensitivity to environmental triggers is thought to contribute to the development of allergic inflammation, frequently starting with type 2 (allergic) skin diseases such as atopic dermatitis (AD)[1] during childhood. AD is a chronic relapsing skin inflammatory disease characterized by severe itching of the skin, eczema and hypersensitivity to otherwise innocuous environmental substances[2]. The etiology of AD is incompletely understood, but many factors, such as genetic or environmental elements and immune or structural cells are thought to contribute to the development of skin lesions[2].

Aberrantly activated type 2 immunity against common sources of indoor allergens such as house dust mites (HDMs) and increased numbers of activated mast cells and eosinophils in the lesional skin[2–4] might have important roles in the pathology of AD. Moreover, 80-100% of patients with AD are colonized with *Staphylococcus aureus,* compared to only 5-30% of healthy individuals[5], and patients whose skin is colonized with exotoxin-producing *S. aureus*, such as staphylococcal enterotoxins B (SEB)[4,6,7] have a higher severity of AD than patients who are colonized with non-toxigenic strains[6]. Finally, although abnormalities of the epidermis leading to loss of skin barrier have been reported to contribute to skin lesions development[8,9,10], many patients with AD don't have loss-of-function mutations of epidermal structural proteins such as filaggrin[11–13]. Therefore, the full spectrum of factors which contribute to skin barrier disorganization and the development of type 2 immunity and skin lesions remains to be determined.

The skin is innervated by an intricate network of nociceptive sensory neurons, known as nociceptors, with cell bodies located in the dorsal root or trigeminal ganglia[14]. Their primary function is the transmission of sensations of temperature, pain and itch in order to elicit

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

appropriate behavioral responses such as withdrawal (to avoid tissue injury) and scratching (to remove irritants). Nociceptors may be involved in manifestations of AD by promoting itch and scratching behavior[13,15], an idea supported by clinical studies showing that the serum of patients with AD exhibits high amounts of neuropeptides, such as the cationic neuropeptide substance P (SP), and that the amounts detected correlate with the severity of the disease[15,16]. While much remains to be learned about itching sensations, peripheral neurons also have the potential to influence immune cells and inflammatory responses[17–22].

Mast cells are innate immune cells thought to be involved in allergic diseases, including AD, in which they recognize a specific antigen through their high-affinity receptors for IgE (FcεRI)[23]. Under homeostatic conditions, skin and peritoneal mast cells in mice specifically express MRGPRB2, a receptor for cationic molecules from the Mas-related G protein-coupled receptors family[24]. MRGPRX2, the human ortholog of MRGPRB2, and not the neurokinin 1 receptor, is the main receptor for cationic molecules, including SP, in human skin mast cells[25,26]. MRGPRX2 or MRGPRB2-mediated activation of mast cells can result in a remarkably fast degranulation dynamics, which is associated with the development of rapid and localized mast cell-dependent inflammation[25].

Whether specialized neuro-immune cross-talk has a role in the development of allergic skin inflammation remains unclear. Combining genetically-modified mouse models with intravital imaging approaches, we show here that a large proportion of $TRPV1^+$ nociceptor projections form physical contacts with $MRGPRB2^+$ mast cells. These neuro-immune clusters can sense the presence of allergic cues and can trigger pathogenic type 2 immune responses and associated lesions in the skin.

Results

Tac1 expression is required for allergic skin inflammation

We used a mouse model of allergic skin inflammation driven by six epicutaneous exposures over one month to two antigens found together in the lesional skin of 80-100% of AD patients[2–7,26], 10 μg of the HDM strain *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) and 500 ng of the bacterial exotoxin SEB from *S. aureus* (Supplementary Fig. 1a,b). Compared to healthy subjects, AD patients often suffer from *S. aureus* skin infections which are thought to play an important role in the pathogenesis and/or worsening of AD[6]. This model recapitulates moderate to severe AD-like disease, associated with both the histopathological features of an exacerbated type 2 immune response and a global gene expression pattern statistically similar to that seen in human AD[8,27]. Wild-type mice sensitized with a combination of SEB and *D. farinae* developed more severe skin inflammation than those treated with SEB or *D. farinae* alone, while *D. farinae* alone induced more skin lesions than SEB alone (Supplementary Fig. 1c,d). Compared to vehicle, treatment with *D. farinae* + SEB induced a systemic *D. farinae*-specific T_H2 response (Supplementary Fig. 1e,f). In accord with reports that patients with moderate to severe AD were treated successfully with dupilumab[28], a human monoclonal antibody against the IL-4 receptor α (IL-4Rα) that inhibits both IL-4 and IL-13 signaling, systemic treatment with blocking antibodies for the mouse IL-4Rα significantly decreased the skin lesions and the histopathological features in the AD-like mouse model (Supplementary Fig. 1g,h). These data indicate that treatment with *D. farinae*

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

+ SEB leads to the development of AD-like allergic skin inflammation dependent on type 2 cytokines.

The neuropeptide SP is thought to be released primarily from a unique subpopulation of $TRPV1^+$ $TRPA1^-$ peptidergic nociceptors that highly express *Tac1*[29], the gene encoding the SP precursor. Using publicly available gene expression data[30], we mapped the expression of *Trpv1*, *Tac1* and *Trpa1* among different mouse tissues and various subpopulations of immune cells. *Trpv1*, *Tac1* and *Trpa1* were highly (or exclusively, in the case of *Trpv1* and *Trpa1*) expressed in dorsal root ganglia (DRG), where the somas of sensory neurons are located, with weak additional expression of *Tac1* in the central and the enteric nervous systems (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1i). In whole-mounted skin biopsies from C57BL/6J wild-type mice, SP expression was restricted to $PGP9.5^+$cutaneous neuronal fibers (Fig. 1b).

To analyze the role of SP in the development of allergic skin inflammation, we treated wild-type and $Tac1^{-/-}$ mice with *D. farinae* + SEB and assessed the development of key pathological features associated with AD[8]. Compared to vehicle-treated wild-type mice, *D. farinae* + SEB-treated wild-type mice developed macroscopic skin lesions (Fig. 1d), increased epidermal thickness, strong infiltration of eosinophils and neutrophils (Fig. 1e) and elevated serum *D. farinae*-specific IgG_1 and IgE (Fig. 1f), along with a profound alteration of filaggrin protein expression (Fig. 1g,h), a key component of skin barrier function linked to human AD[12]. In addition, *D. farinae* + SEB-treated wild-type mice had increased expression of keratin 6 (K6), a marker of inflammatory stress in keratinocytes (Supplementary Fig. 2a,b) and alterations in claudin-1, K14 and K10 expression (Supplementary Fig. 2c-h). Expressions of two other structural proteins loricrin and E-cadherin were not significantly affected (Supplementary Fig. 2i-l). By contrast, *D. farinae* + SEB-treated $Tac1^{-/-}$ mice were mostly protected from disease, with substantial reduction in skin lesion development, histological abnormalities, infiltration of immune cells, serum levels of *D. farinae*-specific IgG_1 and IgE and changes in skin barrier architecture (Fig. 1c-h and Supplementary Fig. 2). Taken together, this data suggested that expression *of Tac1* and SP was restricted to the neuronal compartment of the skin and that expression of *Tac1* was required for the full development of the pathological features associated with allergic skin inflammation in this model.

HDMs directly activate substance P-producing $TRPV1^+$ neurons

To analyze the role of $TRPV1^+$ nociceptors in the development of allergic skin inflammation, we treated wild-type mice systemically with resiniferatoxin (RTX), which is a potent TRPV1 agonist selectively ablating $TRPV1^+$ nociceptors[17,18] (Supplementary Fig. 3a,b). RTX-treated mice and control DMSO-treated mice were subsequently treated with *D. farinae* + SEB to induce allergic skin inflammation. RTX-treated mice had a strong reduction of skin lesions (Fig. 2a,b) and lesion-associated histopathological features compared to control DMSO-treated mice (Fig. 2c), along with restored filaggrin organization and decreased expression of the stress marker K6 (Supplementary Fig. 3), suggesting that $TRPV1^+$ nociceptors were required for the full development of allergic skin inflammation in this model.

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

The primary function of nociceptors is to detect potentially damaging stimuli and initiate appropriate behavioral responses such as removal or scratching. We investigated whether *D. farinae* and SEB were directly detected by TRPV1$^+$ DRG neurons cultured *ex vivo*. We found that 5 ng/ml SEB alone induced only a weak (barely detectable in some experiments) influx of calcium in DRG neurons (Fig. 2d,e), while concentrations ranging from 5 ng/ml of *D. farinae*, either alone (Fig. 2d,f) or in combination with 5 ng/ml SEB (Fig. 2d,g) triggered an increase in intracellular calcium in a subpopulation of DRG neurons that also responded to the TRPV1 agonist capsaicin (Fig. 2h,i).

D. farinae alone or in combination with SEB also triggered the secretion of SP from DRG neurons, with a tendency, in some experiments, for *D. farinae* + SEB to trigger less secretion of SP compared to either alone (Fig. 2j). Moreover, cultured DRG neurons from RTX-treated mice did not secrete SP in response to *D. farinae* alone or *D. farinae* + SEB, while DRG neurons from DMSO-treated mice secreted SP (Fig. 2k). Importantly, DRG neurons from RTX-treated mice were also unresponsive to capsaicin (Fig. 2k) indicating that *in vivo* RTX-treatment efficiently depleted TRPV1$^+$ neurons. These data indicated that *D. farinae* directly triggered the secretion of SP from TRPV1$^+$ DRG neurons cultured *ex vivo*.

Next, we investigated by which mechanism *D. farinae* activated TRPV1$^+$ DRG neurons. Treatment of DRG neurons with NBP2-29328, a MYD88 inhibitory peptide[8], did not prevent *D. farinae*-induced activation of DRG neurons compared to DRG neurons treated with a non-relevant control peptide (Supplementary Fig. 4a,b), indicating that, at least under the culture conditions used here, DRG neurons activation was not dependent on MYD88-dependent signaling through Toll like receptors (TLR). Next, we investigated whether the proteolytic activity of *D. farinae* was required for triggering DRG neuron activation *ex vivo*. Like other common environmental allergens, HDM strains, including *D. farinae*[31] have intrinsic proteolytic activity that can degrade epithelial junctions[32–35] or full-length IL-33[36] *in vivo*. To characterize the type of proteolytic activity present in the *D. farinae* extracts used, we measured the proteolytic activities of *D. farinae* with or without specific and irreversible inhibitors of cysteine or serine protease activities. Pretreatment with the cysteine protease inhibitor E64, but not with the serine protease inhibitor AEBSF, completely inhibited the proteolytic activity of *D. farinae*, at levels comparable to heat-inactivation of *D. farinae* (Fig. 3a). No proteolytic activity was measured in the absence of dithiothreitol (DTT), a reducing agent required for cysteine protease activity in cell-free conditions (Fig. 3a), indicating the presence of cysteine protease activities in the *D. farinae* extract. SEB alone neither exhibited protease-like activity nor enhanced *D. farinae* proteolytic activity (Supplementary Fig. 4c).

Heat-induced inactivation or treatment with E64 prevented the influx of calcium in TRPV1$^+$ DRG neurons by *D. farinae ex vivo* (Fig. 3b-e). However, TRPV1$^+$ DRG neurons activation was independent of the expression of the protease-activated receptor PAR2 by the neurons (Supplementary Fig. 4a,b). We next investigated whether other clinically-relevant environmental allergens with either predominant cysteine protease activity, such as the HDM strain *D. pteronyssinus*[31] or serine-like protease activities[36] from pollen (ragweed), fungus (*Alternaria alternata*) or the German cockroach could also directly activate DRG neurons. Only *D. pteronyssinus* triggered significant influx of calcium in DRG neurons, comparable

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

to those obtained after stimulation with *D. farinae* (Fig. 3f). These data indicate that two common HDM strains with predominant cysteine protease activity involved in allergic inflammation and suspected to have major roles in various allergic disorders, could trigger the activation of a subset of nociceptors directly, predominantly via a cysteine protease activity-dependent mechanism.

Functional MRGPRB2 is required for allergic skin inflammation

Mouse MRGPRB2 and its human ortholog, MRGPRX2 are mast cell-restricted receptors for several cationic substances, including the neuropeptide SP. We used *Kit*-dependent $Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$ mast cell-deficient mice, in which KIT, the receptor for the main mast cell growth and survival factor SCF is mutated, and *Kit*-independent *Cpa3*-Cre^{+}*Mcl-1*$^{fl/fl}$ mast cell-deficient mice, in which the antiapoptotic factor Mcl-1 is deleted in the mast cell lineage (Supplementary Fig. 5 and Supplementary Fig 6a-d) to study the role of mast cells in the development of allergic skin inflammation. After treatment with *D. farinae* + SEB, both $Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$ and *Cpa3*-Cre^{+}*Mcl-1*$^{fl/fl}$ mice had a marked reduction in skin lesions compared to $Kit^{+/+}$ and *Cpa3*-Cre^{-}*Mcl-1*$^{fl/fl}$ littermate controls, respectively (Supplementary Fig. 5). Importantly, *Tac1*$^{-/-}$ mice or RTX-treated wild-type mice had normal numbers of dermal mast cells (Supplementary Fig. 6e,f), indicating that the reduced pathological features in these mice after treatment with *D. farinae* + SEB could not be attributed simply to a lack or reduction in the number of skin mast cells.

To assess whether MRGPRB2 contributed to the development of allergic skin inflammation, we used *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ mice, in which MRGPRB2 is genetically inactivated by mutation, but have normal numbers of mast cells[24] (Supplementary Fig. 6g,h). In contrast to *Mrgprb2*$^{+/+}$littermates, *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ mice did not develop allergic skin inflammation after treatment with *D. farinae* + SEB, and had substantial reductions in skin lesions (Fig. 4a,b), histological abnormalities, infiltration of eosinophils and neutrophils (Fig. 4c), *D. farinae*-specific IgE (Fig. 4d) and disruption of skin barrier architecture (Fig. 4e,f and Supplementary Fig. 7), suggesting that MRGPRB2 expressed on mast cells contributed to the development of this model of allergic skin inflammation induced by *D. farinae* + SEB.

TRPV1^{+} nociceptors activate skin mast cells through MRGPRB2

We next explored whether *D. farinae* and SEB triggered the degranulation of dermal mast cells *in vivo* through the activation of TRPV1^{+}*Tac1*$^{+}$ nociceptors and MRGPRB2. A single intradermal (i.d.) injection of sulforhodamine 101-labeled avidin (Av-SRho) can be used to monitor skin mast cell granule structures specifically in live mice by two-photon microscopy or *ex vivo* by confocal microscopy[37]. We injected vehicle or 1 μg *D. farinae* + 50 ng SEB i.d. into the ear pinna of Av.SRho-injected mice and measured tissue swelling, as an early readout of inflammation and Av.SRho^{+} mast cell degranulation in whole-mounted ear skin using *ex vivo* volumetric confocal microscopy 45 minutes post *D. farinae* + SEB injection (Supplementary Fig. 8a). I.d. injection of vehicle induced very mild swelling of the ear tissue (Fig. 5a) and did not trigger substantial skin mast cell degranulation (Fig. 5b,c) in DMSO-treated wild-type mice or *Mrgprb2*$^{+/+}$ mice, while injection of *D. farinae* + SEB induced strong ear swelling (Fig. 5a) and abundant degranulation of Av.SRho^{+} mast cells (Fig. 5b,d). After injection of *D. farinae* + SEB, RTX-treated wild-type mice or

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Mrgprb2$^{mut/mut}$ mice had a substantial reduction of both ear swelling (Fig. 5a) and degranulation of Av.SRho^{+} mast cells (Fig. 5b,d) compared to DMSO-treated wild-type or *Mrgprb2*$^{+/+}$ mice. Wild-type mice injected i.d. with blocking antibodies against SP had a strong reduction of both ear swelling (Fig. 5e) and mast cell degranulation (Fig. 5f,g) compared to IgG isotype-treated control mice. In addition, a 30 minute pretreatment of *D. farinae* + SEB with the cysteine protease inhibitor E64 decreased ear swelling significantly (Supplementary Fig. 8b,c). *D. farinae* and/or SEB did not trigger the degranulation of *in vitro*-cultured mouse or human mast cells at the tested concentrations (Supplementary Fig. 8d,e).

We next tested whether activation of TRPV1^{+} nociceptors in the skin using the TRPV1 agonist capsaicin would result in MRGPRB2-dependent mast cell degranulation *in vivo*. I.d. injection of 1 μM capsaicin did not induce significant ear tissue swelling (Fig. 5h) or Av.SRho^{+} mast cell degranulation (Fig. 5i,j) in RTX-treated wild-type mice or *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ mice, while strong ear swelling (Fig. 5h) and linked degranulation of Av.SRho^{+} mast cells (Fig. 5i,j) were observed in DMSO-treated wild-type and *Mrgprb2*$^{+/+}$mice, indicating that the effect was largely dependent on TRPV1^{+} nociceptors and MRGPRB2. These results indicate that, upon i.d. injection of *D. farinae* + SEB or capsaicin, the observed mast cell degranulation and associated early signs of inflammation require functional TRPV1^{+} nociceptors, release of SP and signaling through MRGPRB2.

Next, we adapted the fluorescent avidin-based mast cell imaging approach to visualize the activation of TRPV1^{+} nociceptors and the activation of mast cells simultaneously using intravital two-photon microscopy[37]. For this purpose we used Pirt-GCaMP3 mice, in which expression of the calcium tracer GCaMP3 is driven by the *Pirt* promoter in sensory neurons[38] in order to track the spatiotemporal dynamics of skin mast cell granule structures and TRPV1^{+} nociceptors activation in living mice (Supplementary Fig. 8f). Low basal expression of GCaMP3 fluorescence (Fig. 6a,b and Supplementary Fig. 8g) in sensory neurons, but no degranulation of Av.SRho^{+} mast cells (Fig. 6a,c and Supplementary Fig. 8h) were detected after i.d. injection of vehicle. In contrast, i.d. injection of 1 μM of the TRPV1 agonist capsaicin induced strong increases in GCaMP3 fluorescence (Fig. 6a,b and Supplementary Fig. 8g), revealing the presence of an abundant network of activated TRPV1^{+} nociceptors in the mouse dermis, as well as degranulation of ~50-60 % of Av.SRho^{+} mast cells (Fig. 6a,c and Supplementary Fig. 8h). After i.d. infusion of 1 μg *D. farinae* + 50 ng SEB, either in combination or separately, in Av.SRho-labelled Pirt-GCaMP3 mice we observed a significant increase in GCaMP3 fluorescence in skin neurons compared to vehicle-injected mice (Fig. 6a,b) and degranulation of ~ 50% Av.SRho^{+} mast cells (Fig. 6a,c), suggesting that the presence of *D. farinae* and/or SEB antigens in the dermis could lead to the activation of TRPV1^{+} nociceptors and mast cells *in vivo*. Finally, we used an automated computer-assisted calculation method to perform an unbiased analysis of the spatial organization of activated TRPV1^{+} nociceptors and Av.SRho^{+} mast cells in the dermis of Pirt-GCaMP3 mice as assessed by live imaging. About 62 % of Av.SRho^{+} mast cells either formed contacts with activated TRPV1^{+} nociceptors in the skin (25%) or resided in close proximity to activated nociceptors (37% of Av.SRho^{+} mast cells were within less than 25 μm from activated TRPV1^{+} nociceptors) (Fig. 6d-f). These data suggest that mast cells and TRPV1^{+} nociceptors formed cellular clusters in the skin that can be activated in the

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

presence of *D. farinae* and SEB. Together, these results indicated that the ear swelling observed upon i.d. injection of *D. farinae* + SEB resulted from the activation of skin TRPV1$^+$ nociceptors which induced the degranulation of mast cells through the release of SP and the activation of MRGPRB2.

Discussion

Here we found that TRPV1$^+$ *Tac1*$^+$ nociceptors and MRGPRB2$^+$ mast cells formed clusters in the mouse skin that could be activated by allergens, such as HDMs. This, in turn, drove the development of type 2 immunity-associated skin inflammation in mice that mimicked many features of human AD. In addition, our results identified MRGPRB2 as a key receptor that facilitated communication between skin mast cells and TRPV1$^+$ *Tac1*$^+$ nociceptors.

Based on the generated high-resolution 3D images, it is interesting to speculate that the close anatomical co-localization of mast cells and TRPV1$^+$ nociceptors in the mouse dermis might enable the accumulation of high enough amounts of secreted neuropeptide such as SP to reach the previously reported high activation threshold of MRGPRB2[39]. Fixed biopsies have indicated proximity or contact between nerve fibers and mast cells in mice, pigs and humans[40–43], while mouse and human mast cells can be directly activated by neuropeptides (including SP) *in vitro*[25,42,44]. A bi-directional activation process between mast cells and submucosal neurons in cultured gut biopsies has been reported[45]. Our study offers direct evidence of functional interactions between nociceptors and mast cells *in vivo* and identified these interactions as a critical element in the development of type 2 skin inflammation. Targeting SP-enabled interactions between TRPV1$^+$ nociceptors and MRGPRX2$^+$ mast cells might therefore represent a promising therapeutic approach for the prevention and/or treatment of human AD pathology.

Recent studies have reported that MRGPRB2 on mast cells has an important role in the regulation of inflammatory pain[46] and itch sensation[47]. SP and MRGPRB2 were reported to be directly involved in the regulation of inflammatory mechanical and thermal hyperalgesia, and in the recruitment of innate immune cells at the site of injury[46]. In addition, compared to activation through canonical FcεRI, mast cell activation through MRGPRB2 induces itch distinct from classical histaminergic itch[47]. MRGPRB2-mediated activation of mast cells results in the differential release of granule-associated mediators (including some with known pruritogen function such as histamine, serotonin or tryptase), and MRGPRB2 deficiency significantly decreases itch in different models of allergic contact dermatitis, which is thought to be associated with pathogenic CD8$^+$ T cell responses[48]. These observations indicate that MRGPRB2 activation on mast cells modulates the transmission of sensations of pain and itch in different inflammatory contexts.

Mast cells can drive certain types of IgE-independent pseudo-allergic reactions through the binding of a wide range of cationic drugs (such as the FDA-approved mivacurium or icatibant) to MRGPRX2 or MRGPRB2[24,49,50]. It is tempting to speculate that MRGPRX2 or MRGPRB2-mediated mast cell activation by cationic drugs could lead to the activation of nociceptors at the site of injection and the subsequent development of pain and/or itch. However, more *in vivo* work is needed to define whether the clusters of TRPV1$^+$ *Tac1*$^+$

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

nociceptors and MRGPRB2^{+} mast cells described here are involved in drug-induced adverse events.

We found that *D. farinae*, but not SEB, directly activated TRPV1^{+} DRG neurons *ex vivo* through a cysteine protease-dependent mechanism. We can't rule out the possibility that direct effects of *D. farinae* and/or SEB on skin mast cells, apart from effects on degranulation, also may have contributed to our findings. However, the data presented suggest that, under the conditions studied, *D. farinae* + SEB-induced cutaneous inflammation required TRPV1^{+} nociceptors and the release of SP, which then activated skin mast cells.

Most patients with severe AD are colonized with exotoxin-producing *S. aureus*[4,6,7]. In agreement to that, we found that *D. farinae* in combination with SEB triggered the development of more severe skin inflammation than when the two antigens were used separately. While SEB alone did not activate DRG neurons cultured *ex vivo*, after i.d. injection *in vivo* it triggered GCaMP3 fluorescence in skin neurons comparable to that observed after injection of *D. farinae*. This might indicate that SEB activated nociceptors through an indirect mechanism; however, the precise mechanism(s) remain(s) to be elucidated. It is possible that SEB, which is known to be a potent superantigen, could also favor the proliferation of T cells in our model. However, SEB treatment alone in wild-type mice triggered less severe skin inflammation and skin lesions than treatment with *D. farinae* alone. It is therefore possible that a direct mechanism of nociceptor activation by *D. farinae* cysteine protease activity might be required to efficiently trigger the development of this model of *D. farinae* + SEB-induced allergic skin inflammation.

The sensing of allergen-associated proteolytic activity has been proposed to be an important mechanism of environmental allergen detection that could contribute to the initiation of allergic diseases[31,36]. Our data suggest that the clusters of TRPV1^{+} nociceptors and MRGPRB2^{+} mast cells might represent tissue-resident "sensory systems" that would detect allergens with cysteine-like protease activity in the skin and initiate type 2 immunity-associated allergic skin disease. Sensory nerve fibers and mast cells are also present in the upper airways, lungs and gastro-intestinal tract, which are organs continuously exposed to environmental allergens and within which allergic diseases are also known to develop. However, the extent to which neuron-mast cell clusters are involved in the development of other allergic disorders in different organs remains to be investigated.

Methods

Mice

Four- to 8-week-old C57BL/6J and *Tac1*$^{-/-}$ mice were purchased from Charles River or the Jackson Laboratory; both age-matched male and female mice were used in experiments. *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ mice (which are homozygous for a mutation that induces a genetic inactivation of *Mrgprb2*[24]) and Pirt-GCaMP3 mice (in which a genetically encoded calcium tracer [GCaMP3] is driven into sensory neurons by the *Pirt* promoter[38]) were provided by X. Dong and both male and female mice were used in experiments. The mast cell-deficient *Kit*$^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$ and *Cpa3-cre*$^{+}$*;Mcl-1*$^{fl/fl}$ mice have been described previously[25,37]; both male

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

and female mice were used in experiments. PAR-2-deficient mice were a generous gift from N. Vergnolle. Mice were bred and housed in the local animal facilities of CREFRE (Toulouse, France) or Stanford University (CA, USA), and littermate control mice were used in all experiments. All animal care and experimentation were conducted in France and in the USA. Experiments conducted in USA (Galli Lab, Stanford University, CA) were in compliance with the guidelines of the National Institutes of Health (NIH) and the Institutional Animal Care and Use Committee of Stanford University. Experiments conducted in France (Gaudenzio Lab, INSERM, University of Toulouse) were in compliance with the guidelines of the European Union (86/609/EEC) and the French Committee of Ethics (87/848) policies and with the specific approval from the local ministry-approved committee on ethics in animal experimentation (Ethics Committee UMS006 CEEA-122, project n° 13283 2018031416055447V3). 8 to 12-week-old mice were used in experiments, excepted for RTX treatment for which 4-week-old mice were used.

Reagents and antibodies

Sodium citrate, Bovine Serum Albumin (BSA), DMSO, saponin, Capsaicin, Resiniferatoxin and Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) were from Sigma-Aldrich. HDM extracts of the strain *Dermatophagoides farinae* were purchased from Greer Laboratories. The following antibodies were obtained from Covance: anti-Keratin (K) 14, anti-K6, anti-K10, anti-loricrin and anti-filaggrin. Anti-Claudin 1 was from Abcam. Alexa594-conjugated goat anti-rabbit IgG, Alexa488-conjugated avidin and DAPI were from Life Technologies Invitrogen. The following reagent and antibodies were from eBioscience Thermofisher Scientific: CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, anti-CD4-APC, anti-IL4-PE, anti-IL-5-PE, anti-IL-13-PE, and anti-IFNγ-PE. Purified NA/LE Rat Anti-Mouse CD124 (mIL4R-M1) or control Istoype (R35-95) were from BD Bioscience. MYD88 inhibitory peptide (i.e., a cell permeant peptide sequence that selectively blocks MYD88 homodimerization) and a control peptide (i.e., an inactive and cell permeant truncated form of the MYD88 inhibitory peptide) were from Novus. *Alternaria alternata (A. alternata), Dermatophagoides pteronyssinus (D. pteronyssinus)*, ragweed and German Coackroach were all from Stallergenes Greer.

Model of allergic skin inflammation

Allergic skin inflammation was induced as previously described[8,27] (described in Supplementary Fig. 1). Briefly, back skin was shaved and a solution of 500 ng of Staphylococcal enterotoxin B (SEB, Sigma-Aldrich) and of 10 μg of *Dermatophagoides farinae* extract (HDM, Stallergen Greer) in PBS was applied on a gauze pad placed on the shaved back and occluded with a Tegaderm™ Transparent Dressing (3M HealthCare). Three days later, the gauze pads were replaced. Mice were monitored on a daily basis and if a mouse removed the bandage, a new dressing was immediately applied on this mouse and all of the other mice within the same experiment (so that they received the same treatment and equal amounts of antigens). Four days later, dressings were removed and mice were kept without treatment for the next week. This "3 + 4 days" pattern of treatment was repeated two more times, so that the mice were subjected to three cycles of such treatment. Two days after the last cycle of treatment, the mice were euthanized and back skin specimens corresponding to the treated areas were obtained for analyses. In a set of experiments, mice were also treated with either IgG isotype control or anti-CD124 antibody (100 μL; i.p.) at 2.8 mg/kg

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

twice a week for the entire period of treatment. The last treatment with either of these antibodies was done one day before sacrifice. This model has been efficiently used in both Inserm Toulouse and Stanford University and key experiments have been repeated in both animal facilities.

Ablation of Trpv1$^+$ nociceptors in mice

To ablate Trpv1$^+$ nociceptors, 4-week-old C57BL/6J mice were subcutaneously injected with increasing resiniferatoxin (RTX) doses of 30 μg/kg, 70 μg/kg and 100 μg/kg in 100 μL of PBS for 3 consecutive days. Control mice were injected with similar volumes of DMSO in 100 μL of PBS. 4 weeks later, denervation was assessed using the classical tail flick assay.

Peripheral blood mononuclear cell-derived human mast cell culture

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from buffy coats of healthy blood donors at the Etablissement Francais du Sang (EFS) and were cultured as described in *Gaudenzio et al.*[25]. Briefly, isolated CD34$^+$ cells (EasySep Human CD34 Positive Selection Kit, STEMCELL Technologies) were cultured for one to two weeks in StemSpan medium (STEMCELL Technologies) supplemented with recombinant human IL-6 (50 ng/ml; Peprotech), human IL-3 (10 ng/ml; Peprotech), ciprofloxacin (10 μg/ml; Sigma-Aldrich) and 3% supernatant of CHO transfectants secreting mouse SCF. After two weeks, cells were transferred to IMDM Glutamax supplemented with sodium pyruvate, 2-β-mercaptoethanol (50 μM), 0.5% BSA, 1% insulin transferrin selenium (all from Invitrogen), ciprofloxacin (10 μg/ml; Sigma-Aldrich), IL-6 (50 ng/ml) and 3% supernatant of Chinese hamster ovary (CHO) transfectants secreting mouse SCF. Mast cells were usually ready for experiments after ~10 weeks in culture.

Bone marrow-derived cultured mouse mast cells (BMCMCs)

Hematopoietic cells were collected from C57BL/6 mouse femurs and cultured in DMEM supplemented with L-Glutamax, 2-β-mercaptoethanol (50 μM; Invitrogen), murine IL-3 (10 ng/mL; Peprotech), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen) and Peni/Strep (100X). Twenty-four hours later, adherent cells were removed, and fresh culture medium was added to non-adherent cells. Three days later, cells were resuspended in fresh culture medium. The same procedure was repeated twice a week. Cells were used for experiments between week 4 and week 10.

β-Hexosaminidase release assay

Human mast cells were incubated in culture medium with or without human IgE (1 μg/mL; Sigma-Aldrich) overnight at 37°C. BMCMCs were incubated with or without anti-dinitrophenol (DNP) IgE (0.5 μg/mL; Sigma Aldrich) overnight at 37°C. The cells were then washed and distributed in 96-well flat-bottom plates at a density of 10^5 cells in 50 μL of Tyrode's buffer at 37°C. 40 minutes later, cells were treated with 50 μL of prewarmed stimuli diluted in Tyrode's buffer for 45 minutes at 37°C. As a positive control of functional activation, human mast cells were stimulated with anti-IgE (10 ng/mL; Euromedex) and BMCMCs with DNP-BSA (10 ng/mL; Sigma Aldrich). To assess whether AD antigens could activate mast cells, human mast cells and BMCMCs were stimulated with increasing

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

concentrations of *D. farinae* and SEB (5 ng/mL, 50 ng/mL and 500 ng/mL), alone or together. β-Hexosaminidase release in the supernatants was measured as previously described[25].

Intracellular flow cytometry of *D. farinae*-specific CD4$^+$ T cells

Following induction of allergic skin inflammation, spleens from vehicle-treated or *D. farinae* + SEB-treated mice were harvested and dissociated to obtain a suspension of cells. 200,000 spleen cells were stained with CFSE for 7 minutes at 37°C and incubated for 5 days with 10 μg/ml of *D. farinae* in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS GlutaMAX-I, sodium pyruvate, 2-mercaptoethanol, and 10μg/ml ciprofloxacin. Intracellular cytokines were analyzed by gating on proliferating (CFSE^{low}) CD4$^+$ T cells after a 5-hour restimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/mL, Sigma) and ionomycin (1 mg/mL, Sigma) in the presence of GolgiStop (BD Pharmingen). Cells were fixed, permeabilized (0.1% saponin in PBS 0.5% BSA), and stained with antibodies directed against mouse IL-4, IL-5, IL-13 or IFN-γ. Flow cytometric data were acquired on a BD FACSCanto cytometer and were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, Ore).

Skin section preparation, histology, immunofluorescence, and confocal microscopy

Mouse back skin (1-2 cm^2) samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Four-micrometer-thick sections were stained with H&E, and photographs were taken using a Nikon H600L microscope and analyzed with NIS-Elements imaging Software. All sections were “coded” so the evaluator was not aware of their identity, as previously described[8]. Eosinophils and neutrophils were counted on H&E-stained skin sections from all mouse strains. For immunostaining of mouse specimens, 4-μm-thick sections were pretreated using a heat-induced epitope retrieval method[8] in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0), then permeabilized for 30 minutes in PBS supplemented with 0.5% BSA and 0.1% saponin. Permeabilized skin sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, extensively washed, and incubated with appropriate secondary antibodies for 2 hours at room temperature in the dark. Images of 1024 x 1024 pixels were acquired using a Zeiss LSM780 and LSM710 Meta inverted confocal laser-scanning microscopes. Images were processed using Zen software (Zeiss). Epidermal K6, K17, Claudin 1, Filaggrin, Loricrin and E-cadherin mean fluorescence intensities were analyzed using the "measurement function" of ImageJ software on randomly chosen epidermal areas of identical size (i.e., same total number of pixels).

Amounts of serum *D. farinae*-specific IgG1 and IgE antibodies by ELISA

Each incubation step described below was followed by 3 to 5 washing steps using PBS containing 0.05% Tween-20. MaxiSorp ELISA plates (Nunc) were coated with 5 μg/ml *D. farinae* at 4°C overnight. Plates were then blocked with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS for at least 2 hours at room temperature. Sera diluted in PBS containing 1% BSA were added and incubated in the blocked wells for 2 hours at 37°C. Afterwards, biotinylated detection antibodies (rat anti-mouse IgG1 and rat anti-mouse IgE; BD Biosciences; 1:1000) were then added for 1 hour at room temperature followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BD Biosciences; 1:2000) for 30 minutes at room

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

temperature. Reaction was then revealed using supersensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; Sigma Aldrich) substrate and OD was measured at 450 nm.

D. farinae proteolytic activity assay

D. farinae samples were diluted to 200 μg/mL in a reaction buffer composed of Sodium Phosphate 100 mM pH 6, EDTA 10 mM, and DTT 1 mM. The extract was incubated or not with irreversible protease inhibitors (cysteine protease inhibitor E64 100 nM or serine protease inhibitor AEBSF 1 mM) in a reaction volume of 50 μL. Activity was measured using Boc-Gln-Ala-Arg-AMC fluorogenic substrate (200 μM, diluted in the same reaction buffer). *D. farinae* extracts and substrate solutions were incubated separately for 20 minutes at 37°C. Immediately after addition of 50 μL substrate solution on the *D. farinae* extracts, the release of AMC fluorescence was followed over time using a varioskan Flash apparatus (Thermo Scientific). The initial velocity reflecting proteolytic activity was calculated from the kinetics curves. A control was performed by heat-inactivating *D. farinae* extract for 60 minutes at 95°C before addition of substrate. An additional control was performed in a reaction buffer devoid of DTT.

Dorsal Root Ganglia (DRG) dissociation, culture, and Ca^{2+} imaging

DRG neurons from all spinal levels were collected in ice-cold Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μg/mL). DRGs were digested with a mixture of dispase (5 mg/ml) and collagenase type I (1 mg/ml) enzyme at 37°C for 45 minutes. After dissociation, cells were spun at 300*g* and re-suspended in media before being plated on glass coverslips coated with poly-D-lysine (0.5 mg/ml) and laminin (10 μg/ml, Invitrogen) or Lab-tek II chambers slide with cover (Thermo Fisher Scientific). DRGs were cultured in media supplemented with 50 ng/mL NGF at 37°C overnight (12-24 hours) before experimentation. In some experiments, control peptide, or MyD88 inhibitory peptide (100 μM), were added to the DRG cultures for 16 h. Cells were imaged in calcium imaging buffer (CIB; 10 mM HEPES, 1.2 mM $NaHCO_3$, 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 0.6 mM $MgCl_2$, 20 mM glucose, and 20 mM sucrose at pH 7.4 and 290-300 mOsm) or HBSS. To monitor changes in intracellular [Ca^{2+}] ($[Ca^{2+}]_i$), cells were loaded with Fura2-AM or Fluo-4 for 30 minutes in the dark at 37°C in CIB or Hepes /HBSS just prior to imaging. Emission at 520 nm was monitored after excitation at 340 nm (Ca^{2+} bound) or 380 (unbound). Cells were imaged for 20 seconds to establish a baseline before compounds were added. DRG were stimulated with 5 ng/ml *D. farina*e, 5 ng/ml heat-treated *D. farina*e (95°C for 60 minutes), 5 ng/ml *D. farina*e treated with 2.5 pM E64, 37°C for 30 minutes), 5 ng/ml SEB or 1 μM capsaicin. At the end of every imaging trial, 50 mM KCl was added as a positive control. Cells were identified as responding if the intracellular [Ca^{2+}] rose by either 50% compared to baseline or 50% compared to the $[Ca^{2+}]_i$ change assayed during addition of 50 mM KCl (neurons only). Damaged, detached, high-baseline and motion-activated cells were excluded from analyses. Those experiments were performed in the Dong Lab at Johns Hopkins University (and confirmed in the Gaudenzio Lab at INSERM, Toulouse France) in compliance with Johns Hopkins University ethical guidelines and Inserm Toulouse guidelines.

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Quantification of SP secretion

DRG of mice were cultured as described above, rinsed in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma), and incubated in L-cysteine containing 1% Papain (Sigma) for 10 minutes at 37°C. After a wash with filtered Leibovitz's L-15 Medium (Gibco) containing 10% FBS (Sigma), they were incubated in HBSS containing collagenase (1 mg/ml; Sigma) and dispase (4 mg/ml, Sigma) at 37°C for 10 min. After titration, cells were plated in a Poly-D-lysine-laminin (Sigma)-coated 12 well-plate (Corning) and recovered with the complete culture media (DMEM-Glutamax, 2.5% FBS, 1% pen/strep and ARAC, FUDR, uridine – 10 μM each; all from Sigma). Cells were incubated for 5 minutes with vehicle or 5 ng/ml *D. farinae* or 5 ng/ml SEB or and 125 nM capsaicin. Cell supernatants were tested with a Substance P Elisa kit (Enzo) following the manufacturer's recommendations.

Ear pinna injection, mast cell staining, and ear thickness measurement

8 μg of Av.SRho in 20 μl of PBS were injected i.d. into both ear pinnae of WT, *Mrgprb2*$^{mut/mut}$, and RTX-treated mice, and the respective *Mrgprb2*$^{+/+}$ or DMSO-treated control mice, to selectively label mast cell secretory granules *in vivo*, as previously described[37]. 7 days later, ear thickness was measured and then right ear pinnae were injected i.d. with 1 μg *D. farinae* + 50 ng SEB (pre-incubated or not for 30 minutes at 37°C with 100 nM of E64 cysteine protease inhibitor) or 1 μM capsaicin in 20 μl PBS. In some experiments, ear pinnae were injected i.d. with 1 μg *D. farinae* + 50 ng SEB with 15 μg of IgG anti-SP (Sigma Aldrich) in 20 μl PBS. Left ear pinnae were injected with 20 μL of respective control solutions: vehicle alone or in combination with IgG isotype control. 45 minutes later, ear thickness was measured again and mice were euthanized before ear excision. Whole ears were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight, then mounted on microscopy slides and placed under a LSM710 Meta inverted confocal laser-scanning microscope. High resolution Z-stack images 1024 x 1024 pixels of Av.SRho fluorescent signal were acquired using a 20x objective. Images were then processed using Image J and Imaris (Bitplane) softwares.

In vivo two-photon microscopy of living mice

Experiments were conducted as previously described[25,37]. Briefly, 8 μg of Av.SRho in 20 μl of PBS were injected i.d. into the ear pinna of Pirt-GCaMP3 mice. 1 week later, mice were injected i.d. with vehicle, 1 μM capsaicin, or 1 μg *D. farinae* and 50 ng SEB (used alone or in combination) in a final volume of 20 μl then placed under the two-photon microscope on a custom-built 3-D printed mouse platform; anesthesia was maintained by a mixture of Isoflurane/O2 and the animal's ear pinna was kept at 36°C using a heating pad system. The fluorescence corresponding to Av.SRho^{+} mast cell granule structures or GCaMP3^{+} skin neurons was measured using a Prairie Ultima IV two-photon microscope (Spectra Physics Mai Tai HP Ti:sapphire laser, tunable from 690 to 1040 nm). Images were acquired in 3-D up to 100-150 μm depth, with 20x Olympus XLUM Plan Fl N.A. 0.95 water-immersion objective and a software zoom setting of 1 or 3 (8 bits/pixel 1024x1024, scaling x= 0.228 μm, y= 0.228 μm, z= 0.5−μm). Modeling and analysis of fluorescent signals were performed using untreated image sequences, as previously described[25], using Imaris software (Bitplane) and Image J software version Fiji, respectively.

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Automated computational analysis of the minimum distance between mast cells and neurons in the dermis of living mice

1) 3D high resolution images were taken using a Prairie Ultima IV two-photon microscope as described above. The following steps have been automated in the software Imaris Bitplane version 9.2. 2) Hair follicles' autofluorescent signals were modeled into matched 3D objects using the isosurface algorithm. 3) Autofluorescent signals corresponding to the generated isosurfaces were depleted from the GCaMP3 fluorescence detection channel so that the hair follicles were no longer detectable in that particular channel. 4) The filament tracer algorithm was applied in the GCaMP3 fluorescence detection channel in order to precisely trace the trajectories and exact shapes of GCaMP3 fluorescent signals. Filament traces were then converted into fluorescent signals in a new fluorescent channel. 5) Those newly generated fluorescent signals were modeled into matched 3D objects using the isosurface algorithm. The distance transformation algorithm was applied to those new isosurfaces resulting in the generation of a new distance transformation channel. 6) Av.SRho fluorescent signals were modeled into matched 3D objects using the isosurface algorithm. The intensity minimum (i.e., distance minimum in μm) to the distance transformation channel (i.e., modeled sensory neurons) was calculated for each of the Av.SRho$^+$ isosurfaces of at least 5 μm of diameter (corresponding to Av.SRho$^+$ mast cell cellular bodies and excluding small exteriorized Av.SRho$^+$ granules structures). 7) Results per field of view were generated into separated Excel sheets. The exact same procedure was automatically applied to all analyzed 3D images.

Statistics

Statistical tests were performed with the software Prism 6 (GraphPad Software). Two-tailed unpaired/paired Student's *t* tests, 1-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons or Holm-Sidak's post-hoc test were performed on samples as noted in the respective figure legends. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgements

We thank all members of the Galli and Gaudenzio laboratories for discussions, and C. Liu for technical assistance. We thank A. Olson and the Stanford Neuroscience Microscopy Service (supported by NIH NS069375); this article is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NCRR or the NIH), F. L'Faqihi (IFR30, Plateau Technique Cytometrie, Toulouse) and S. Allart (IFR30, Plateau Technique Imagerie Cellulaire, Toulouse) for technical assistance. T.M. is a Research Associate of the F.R.S.-FNRS and is supported by an "Incentive Grant for Scientific Research" of the F.R.S.-FNRS (F.4508.18), by the FRFS-WELBIO under grant CR-2017s-04, the Acteria Foundation and an ERC Starting Grant (IM-ID 801823); P.S. acknowledges support from and the Austrian Science Fund (FWF): P31113-B30; L.L.R. acknowledges support from the European Commission (Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship H2020-MSCA-IF-2014 656086) and the INSERM ATIP-Avenir program. This work was supported by grants from NIH (S.J. Galli: Grants U19 AI104209, R01 AR067145, and R01 AI32494), the United States-Israel Binational Science Foundation (Grant 2013263), and the Sean N. Parker Center for Allergy and Asthma Research, Stanford University (to S.J. Galli); the Société Française de Dermatologie (SFD), the Société Française d'Allergologie (SFA), the Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship (H2020-MSCA-IF-2016 #749629), the European Research Council (ERC-2018-STG #802041) and the INSERM ATIP-Avenir program (to N. Gaudenzio).

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

References

1. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. Allergy Asthma Immunol Res. 2011; 3:67–73. DOI: 10.4168/aair.2011.3.2.67 [PubMed: 21461244]
2. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. Lancet. 2003; 361:151–160. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12193-9 [PubMed: 12531593]
3. Sager N, Feldmann A, Schilling G, Kreitsch P, Neumann C. House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test. J Allergy Clin Immunol. 1992; 89:801–810. [PubMed: 1373161]
4. Langer K, Breuer K, Kapp A, Werfel T. Staphylococcus aureus-derived enterotoxins enhance house dust mite-induced patch test reactions in atopic dermatitis. Exp Dermatol. 2007; 16:124–129. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2006.00523.x [PubMed: 17222226]
5. Park HY, et al. Staphylococcus aureus Colonization in Acute and Chronic Skin Lesions of Patients with Atopic Dermatitis. Ann Dermatol. 2013; 25:410–416. DOI: 10.5021/ad.2013.25.4.410 [PubMed: 24371386]
6. Bunikowski R, et al. Evidence for a disease-promoting effect of Staphylococcus aureus-derived exotoxins in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2000; 105:814–819. DOI: 10.1067/mai.2000.105528 [PubMed: 10756234]
7. McFadden JP, Noble WC, Camp RD. Superantigenic exotoxin-secreting potential of staphylococci isolated from atopic eczematous skin. Br J Dermatol. 1993; 128:631–632. [PubMed: 8338746]
8. Marichal T, et al. Guanine nucleotide exchange factor RABGEF1 regulates keratinocyte-intrinsic signaling to maintain skin homeostasis. J Clin Invest. 2016; 126:4497–4515. DOI: 10.1172/JCI86359 [PubMed: 27820702]
9. Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. Nat Rev Immunol. 2004; 4:978–988. DOI: 10.1038/nri1500 [PubMed: 15573132]
10. Holgate ST. The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. Trends Immunol. 2007; 28:248–251. DOI: 10.1016/j.it.2007.04.007 [PubMed: 17466594]
11. Palmer CN, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. Nature genetics. 2006; 38:441–446. DOI: 10.1038/ng1767 [PubMed: 16550169]
12. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2008; 122:689–693. DOI: 10.1016/j.jaci.2008.08.002 [PubMed: 18774165]
13. Oyoshi MK, He R, Kumar L, Yoon J, Geha RS. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. Adv Immunol. 2009; 102:135–226. DOI: 10.1016/S0065-2776(09)01203-6 [PubMed: 19477321]
14. LaMotte RH, Dong X, Ringkamp M. Sensory neurons and circuits mediating itch. Nature reviews. Neuroscience. 2014; 15:19–31. DOI: 10.1038/nrn3641 [PubMed: 24356071]
15. Salomon J, Baran E. The role of selected neuropeptides in pathogenesis of atopic dermatitis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2008; 22:223–228. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2007.02399.x [PubMed: 18211417]
16. Toyoda M, et al. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2002; 147:71–79. [PubMed: 12100187]
17. Riol-Blanco L, et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. Nature. 2014; 510:157–161. DOI: 10.1038/nature13199 [PubMed: 24759321]
18. Kashem SW, et al. Nociceptive Sensory Fibers Drive Interleukin-23 Production from CD301b+ Dermal Dendritic Cells and Drive Protective Cutaneous Immunity. Immunity. 2015; 43:515–526. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.08.016 [PubMed: 26377898]
19. Cardoso V, et al. Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. Nature. 2017; 549:277–281. DOI: 10.1038/nature23469 [PubMed: 28869974]
20. Baral P, et al. Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil and gammadelta T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia. Nat Med. 2018; 24:417–426. DOI: 10.1038/nm.4501 [PubMed: 29505031]

Europe PMC Funders Author Manuscripts

21. Moriyama S, et al. beta2-adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. Science. 2018; 359:1056–1061. DOI: 10.1126/science.aan4829 [PubMed: 29496881]
22. Wallrapp A, et al. Erratum: The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation. Nature. 2017; 551:658.doi: 10.1038/nature24480
23. Hofmann AM, Abraham SN. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. Curr Opin Immunol. 2009; 21:679–686. [PubMed: 19828301]
24. McNeil BD, et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. Nature. 2014; 519:237–241. DOI: 10.1038/nature14022 [PubMed: 25517090]
25. Gaudenzio N, et al. Different activation signals induce distinct mast cell degranulation strategies. J Clin Invest. 2016; 126:3981–3998. DOI: 10.1172/JCI85538 [PubMed: 27643442]
26. Monti G, Tonetto P, Mostert M, Oggero R. Staphylococcus aureus skin colonization in infants with atopic dermatitis. Dermatology. 1996; 193:83–87. [PubMed: 8884140]
27. Ando T, et al. Mast cells are required for full expression of allergen/SEB-induced skin inflammation. J Invest Dermatol. 2013; 133:2695–2705. DOI: 10.1038/jid.2013.250 [PubMed: 23752044]
28. Beck LA, et al. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. N Engl J Med. 2014; 371:130–139. DOI: 10.1056/NEJMoa1314768 [PubMed: 25006719]
29. Usoskin D, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. Nature neuroscience. 2015; 18:145–153. DOI: 10.1038/nn.3881 [PubMed: 25420068]
30. Lattin JE, et al. Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. Immunome research. 2008; 4:5.doi: 10.1186/1745-7580-4-5 [PubMed: 18442421]
31. Reithofer M, Jahn-Schmid B. Allergens with Protease Activity from House Dust Mites. Int J Mol Sci. 2017; 18doi: 10.3390/ijms18071368
32. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. Immunity. 2015; 43:29–40. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.07.007 [PubMed: 26200011]
33. Locksley RM. Asthma and allergic inflammation. Cell. 2010; 140:777–783. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.004 [PubMed: 20303868]
34. Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defences. Nature. 2012; 484:465–472. DOI: 10.1038/nature11047 [PubMed: 22538607]
35. Stewart GA, Thompson PJ. The biochemistry of common aeroallergens. Clin Exp Allergy. 1996; 26:1020–1044. [PubMed: 8889258]
36. Cayrol C, et al. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. Nat Immunol. 2018; 19:375–385. DOI: 10.1038/s41590-018-0067-5 [PubMed: 29556000]
37. Reber LL, et al. Imaging protective mast cells in living mice during severe contact hypersensitivity. JCI Insight. 2017; 2:e92900.doi: 10.1172/jci.insight.92900
38. Kim YS, et al. Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. Neuron. 2014; 81:873–887. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.011 [PubMed: 24462040]
39. Lansu K, et al. In silico design of novel probes for the atypical opioid receptor MRGPRX2. Nat Chem Biol. 2017; 13:529–536. DOI: 10.1038/nchembio.2334 [PubMed: 28288109]
40. Alving K, et al. Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. Cell and tissue research. 1991; 264:529–538. [PubMed: 1714354]
41. Barbara G, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. Gastroenterology. 2004; 126:693–702. [PubMed: 14988823]
42. Hagiyama M, et al. Increased expression of cell adhesion molecule 1 by mast cells as a cause of enhanced nerve-mast cell interaction in a hapten-induced mouse model of atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2013; 168:771–778. DOI: 10.1111/bjd.12108 [PubMed: 23106683]
43. Pang X, Boucher W, Triadafilopoulos G, Sant GR, Theoharides TC. Mast cell and substance P-positive nerve involvement in a patient with both irritable bowel syndrome and interstitial cystitis. Urology. 1996; 47:436–438. DOI: 10.1016/S0090-4295(99)80469-5 [PubMed: 8633418]

Europe PMC Funders Author Manuscripts

44. Suzuki R, et al. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. J Immunol. 1999; 163:2410–2415. [PubMed: 10452975]
45. Buhner S, et al. Calcium Imaging of Nerve-Mast Cell Signaling in the Human Intestine. Front Physiol. 2017; 8:971.doi: 10.3389/fphys.2017.00971 [PubMed: 29238306]
46. Green DP, Limjunyawong N, Gour N, Pundir P, Dong X. A Mast-Cell-Specific Receptor Mediates Neurogenic Inflammation and Pain. Neuron. 2019; 101:412–420 e413. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.01.012 [PubMed: 30686732]
47. Meixiong J, et al. Activation of Mast-Cell-Expressed Mas-Related G-Protein-Coupled Receptors Drives Non-histaminergic Itch. Immunity. 2019; 50:1163–1171 e1165. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.013 [PubMed: 31027996]
48. Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. Allergy. 2009; 64:1699–1714. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x [PubMed: 19839974]
49. Che D, et al. Mivacurium induce mast cell activation and pseudo-allergic reactions via MAS-related G protein coupled receptor-X2. Cell Immunol. 2018; 332:121–128. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.08.005 [PubMed: 30121125]
50. Takamori A, et al. Identification of inhibitory mechanisms in pseudo-allergy involving Mrgprb2/MRGPRX2-mediated mast cell activation. J Allergy Clin Immunol. 2019; 143:1231–1235 e1212. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.10.034 [PubMed: 30414859]

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

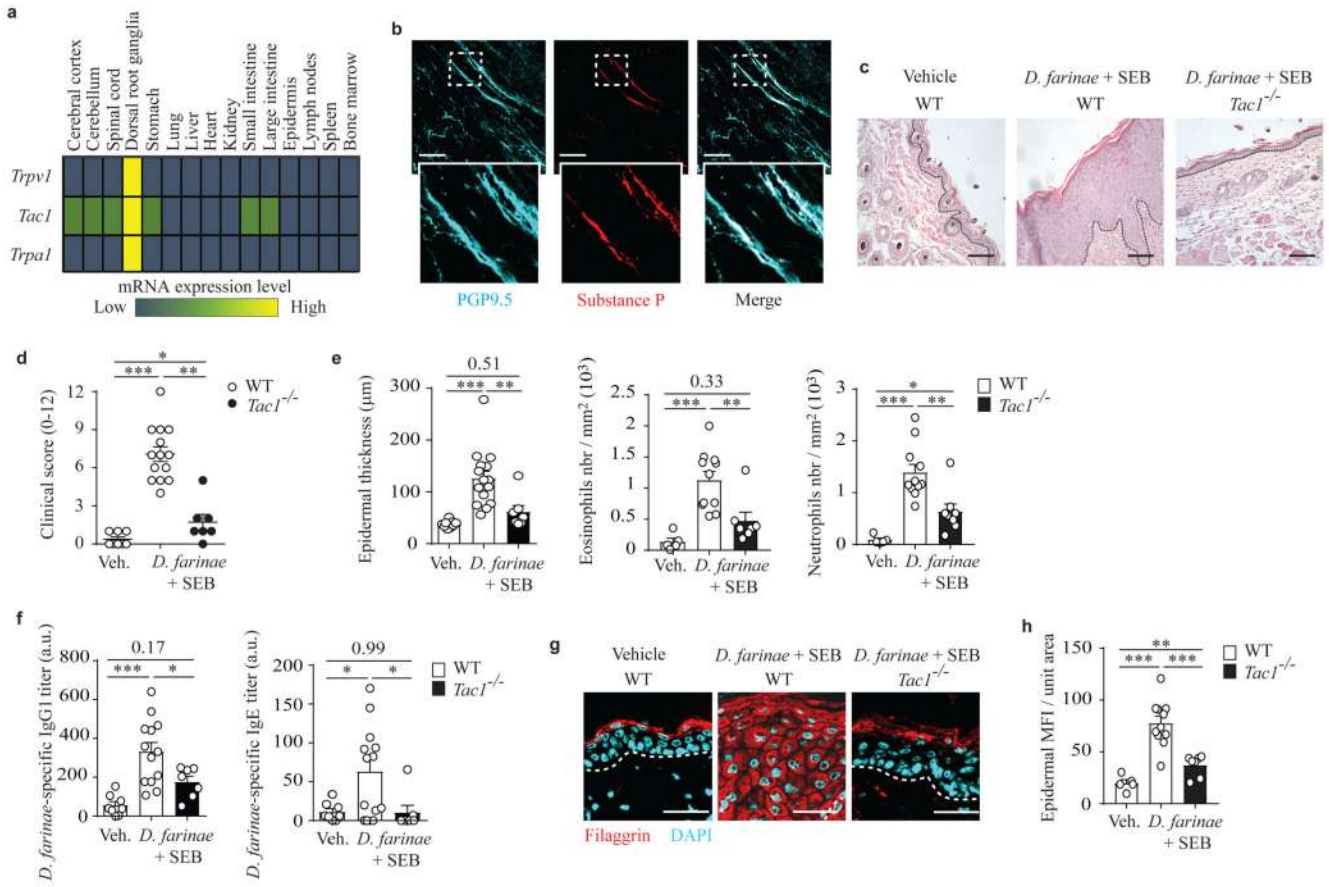


Figure 1. *Tac1* gene expression is required for the full development of pathological features in a model of allergic skin inflammation.

a, Publicly available microarray gene expression data of *Trpv1*, *Tac1* and *Trpa1* in different mouse tissues (GSE 10246); data are shown using a heat map of mRNA expression levels. **b,** Representative 3D confocal microscopy picture of whole-mounted normal back skin stained for PGP9.5 (a pan neuronal marker, cyan) and substance P (red). **c**, Representative hematoxylin & eosin (H&E) staining of vehicle- or *D. farinae* + SEB-treated areas in WT or *Tac1*$^{-/-}$ mice. **d**, Clinical scores (0-12) of vehicle- or *D. farinae* + SEB-treated areas in WT or *Tac1*$^{-/-}$ mice treated as in **c**. **e**, Epidermal thickness (µm) (left), number of eosinophils (middle) and neutrophils (right) in skin sections in WT or *Tac1*$^{-/-}$ mice treated as in **c**. **f**, Serum levels (arbitrary unit [a.u]) of *D. farinae*-specific IgG1 (left) and IgE (right) antibodies in vehicle- or *D. farinae* + SEB-treated WT or *Tac1*$^{-/-}$ mice as in **c**. **g,h,** Representative confocal microscopy pictures of back skin sections (**g**) and fluorescence analysis (**h**) of filaggrin staining in the epidermis of vehicle- or *D. farinae* + SEB-treated areas in WT or *Tac1*$^{-/-}$ mice treated as in **c**. Bars = 100 µm, dotted black (**c**) or white (**g**) lines indicate the junction epidermis/dermis. Each circle = one mouse. Number of mice: (**b**) n = 3; (**c-h**) n = 6 (WT Vehicle), n = 14 (WT *D. farinae* + SEB), n = 7 (*Tac1*$^{-/-}$). (**e**,**f**,**h**) Open bars: WT mice; black bars: *Tac1*$^{-/-}$ mice. (**b-h**) Data from three independent experiments, mean ± SEM (**d**), mean + SEM (**e**,**f**,**h**); 1-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons, *P<.05 **P<.01 ***P<.001.

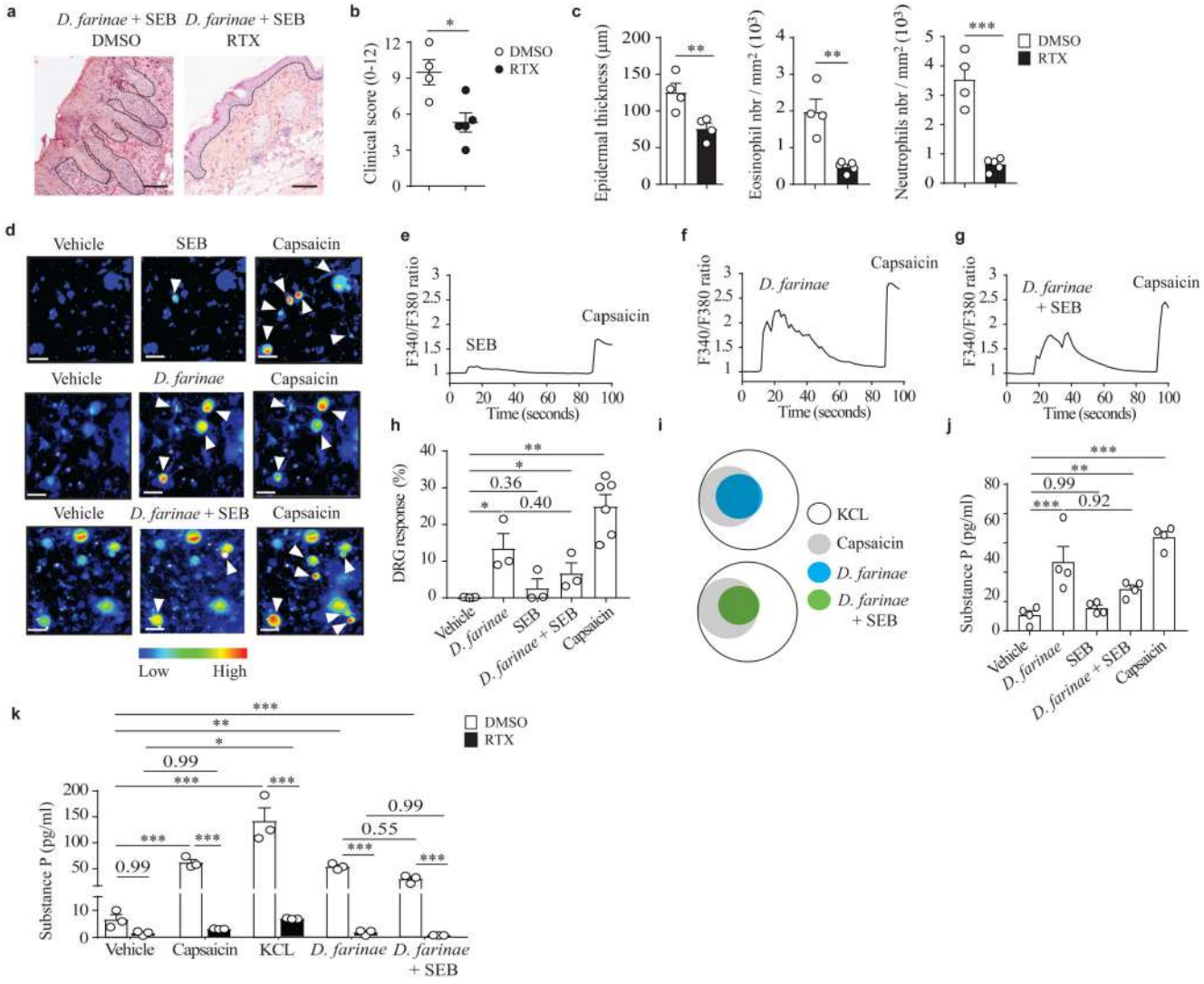


Figure 2. TRPV1$^+$ nociceptors are required for the full development of allergic skin inflammation and *D. farinae* extracts directly induce neuronal activation.

a, Representative H&E staining of *D. farinae* + SEB-treated areas in mock (dimethylsulphoxide [DMSO])-treated or RTX-treated (TRPV1$^+$ nociceptor ablated) mice. **b**, Clinical scores (0-12) of *D. farinae* + SEB-treated areas in DMSO- or RTX-treated mice as in **a**. **c**, Epidermal thickness (µm) (left), number of eosinophils (middle) and neutrophils (right) of *D. farinae* + SEB-treated areas in DMSO- or RTX-treated mice as in **a**. Number of mice: (**a-c**) n = 4 (DMSO) and n = 5 (RTX); data are from two independent experiments; mean + SEM, two-tailed, unpaired t-test, *P<.05 **P<.01 ***P<.001. **d-h**, Representative Fura-2 ratiometric fields (**d**), associated calcium traces (**e-g**) and (**h**) proportion of responding DRG neurons (%) of *ex vivo* cultured DRG neurons (expressed as % of DRG neurons responding to 50 mM KCL) stimulated with 5 ng/ml SEB (top **d**,**e**,**h**) or 5 ng/ml *D. farinae* (middle **d**,**f**,**h**) or both (bottom **d**,**g**,**h**) and 1 µM capsaicin (**d-h**). (**d**) Bars = 50 µm, white arrow heads indicate neurons with increased Fura-2 fluorescence. (**d-h**) Data are from three independent experiments performed with DRGs from n = 3 (for the condition of

Europe PMC Funders Author Manuscripts
Europe PMC Funders Author Manuscripts

vehicle-, *D. farinae*, SEB or *D. farinae* + SEB-treated DRG neurons) and n = 6 (for the condition of capsaicin-treated DRG neurons) different mice; mean + SEM, two-tailed, unpaired t-test, *P<.05 **P<.01. **i**, Venn diagrams of responding DRG neurons. **j,k,** Substance P secretion in DRG neurons cultured *ex vivo* from (**j**) WT mice, (**k**) DMSO (open bars)- versus RTX (black bars)-treated mice and stimulated as indicated. Data are from (**j**) 4 and (**k**) 3 independent experiments, mean + SEM, two-tailed, unpaired t-test, *P<.05 **P<.01 ***P<.001. Each circle = one mouse.

Europe PMC Funders Author Manuscripts

Europe PMC Funders Author Manuscripts

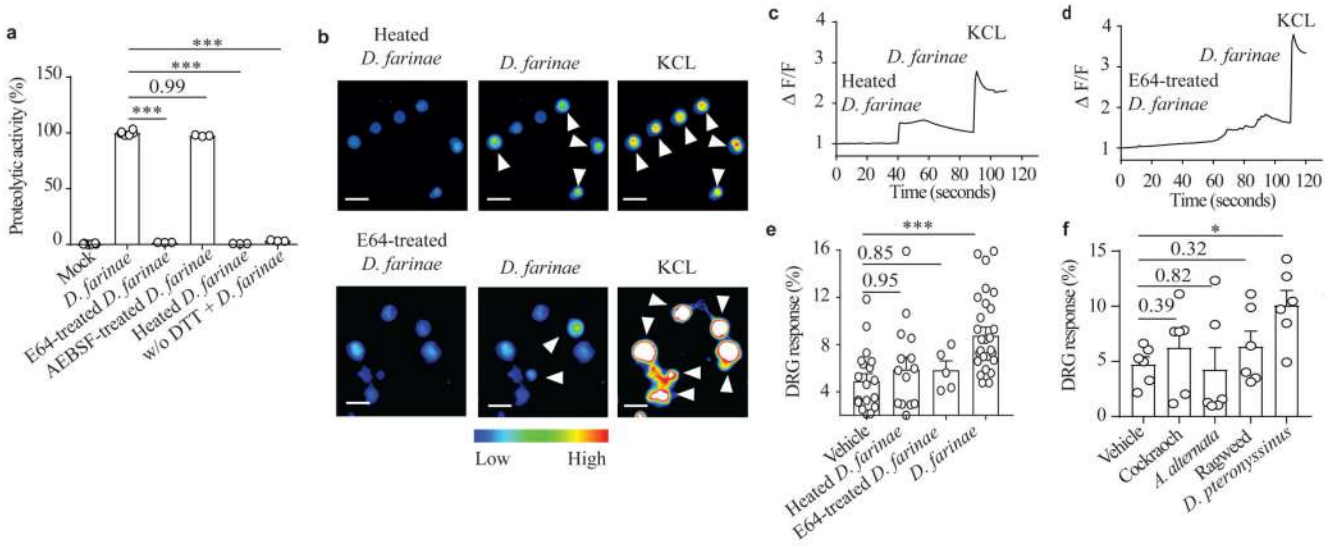


Figure 3. Activation of DRG neurons by *D. farinae* extract depends on cysteine protease activity.

a, Protease activity in *D. farinae* extracts heat inactivated at 95°C for 60 minutes (Heated), or treated with cysteine- (E64, 100 nM) or serine- (AEBSF, 1 mM) protease inhibitors, with or without dithiothreitol (DTT). Data are from three independent experiments performed with three independent biological samples, mean + SEM, One way ANOVA and Holm-Sidak's post- hoc test, *** P<.001. **b-e**, Representative Fura-2 ratiometric fields (**b**), associated calcium traces (**c,d**) and (**e**) proportion of responding DRG neurons (%) in *ex vivo* cultured DRG neurons (expressed as % of DRG neurons responding to 50 mM KCL) stimulated sequentially with 5 ng/ml heated *D. farinae* (top **b,c**) or 5 ng/ml E64 (2.5 pM)-treated *D. farinae* (bottom **b**,**d**), 5 ng/ml *D. farinae* and 50 mM KCL. Data are from five independent experiments performed with 22 (for the conditions Vehicle and *D. farinae*), 14 (for the condition Heated *D. farinae*) and 5 (for the condition E64-treated *D. farinae*) independent experiments performed with independent biological samples, mean + SEM, two-tailed, unpaired t-test, ***P<.001. **f**, Proportion of responding DRG neurons stimulated with either Vehicle, 5 ng/ml *D. pteronyssinus,* 5 ng/ml German cockroach, 5 ng/ml *A. alternata*, or 5 ng/ml ragweed expressed as % of DRG neurons responding to 50 mM KCL. Data are from six independent experiments performed with six independent biological samples, mean + SEM, two-tailed, unpaired *t*-test, *P<.05. Each circle = one mouse.

Europe PMC Funders Author Manuscripts
Europe PMC Funders Author Manuscripts

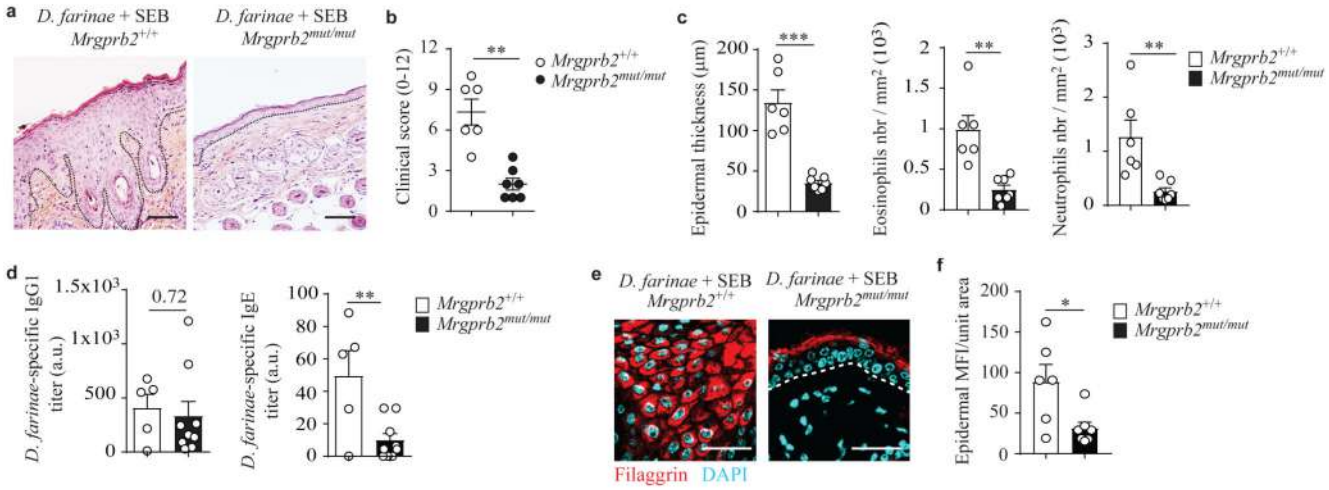


Figure 4. Genetic inactivation of MRGPRB2 largely prevents development of pathology in a model of allergic skin inflammation.

a, Representative H&E staining of *D. farinae* + SEB-treated areas in *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ and *Mrgprb2*$^{+/+}$ mice; dotted black lines indicate the junction epidermis/dermis. **b**, Clinical scores (0-12) of *D. farinae* + SEB-treated areas in *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ and *Mrgprb2*$^{+/+}$ mice as in **a**. **c**, Epidermal thickness (µm) (left), number of eosinophils (middle) and neutrophils (right) in *D. farinae* + SEB-treated areas in *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ and *Mrgprb2*$^{+/+}$ mice treated as in **a**. **d**, Serum levels (arbitrary unit [a.u]) of *D. farinae*-specific IgG1 (left) and IgE (right) antibodies of *D. farinae* + SEB-treated *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ and *Mrgprb2*$^{+/+}$ mice as in **a**. **e,f,** Representative confocal microscopy of back skin section (**e**) and fluorescence analysis (**f**) of filaggrin staining of *D. farinae* + SEB-treated areas in *Mrgprb2*$^{mut/mut}$ and *Mrgprb2*$^{+/+}$ mice as in **a**. White lines indicate the junction epidermis/dermis. Bars = 100 µm. Each open circle = one mouse. Number of mice: (**a-c,e,f**) n = 6 (*Mrgprb2*$^{+/+}$), n = 7 (*Mrgprb2*$^{mut/mut}$); (**d**) n = 5 (*Mrgprb2*$^{+/+}$), n = 9 (*Mrgprb2*$^{mut/mut}$). Mean ± SEM (**b**), mean + SEM (**c,d,f**), two-tailed, unpaired *t*-test, *P<.05 **P<.01 ***P<.001.

Europe PMC Funders Author Manuscripts
Europe PMC Funders Author Manuscripts

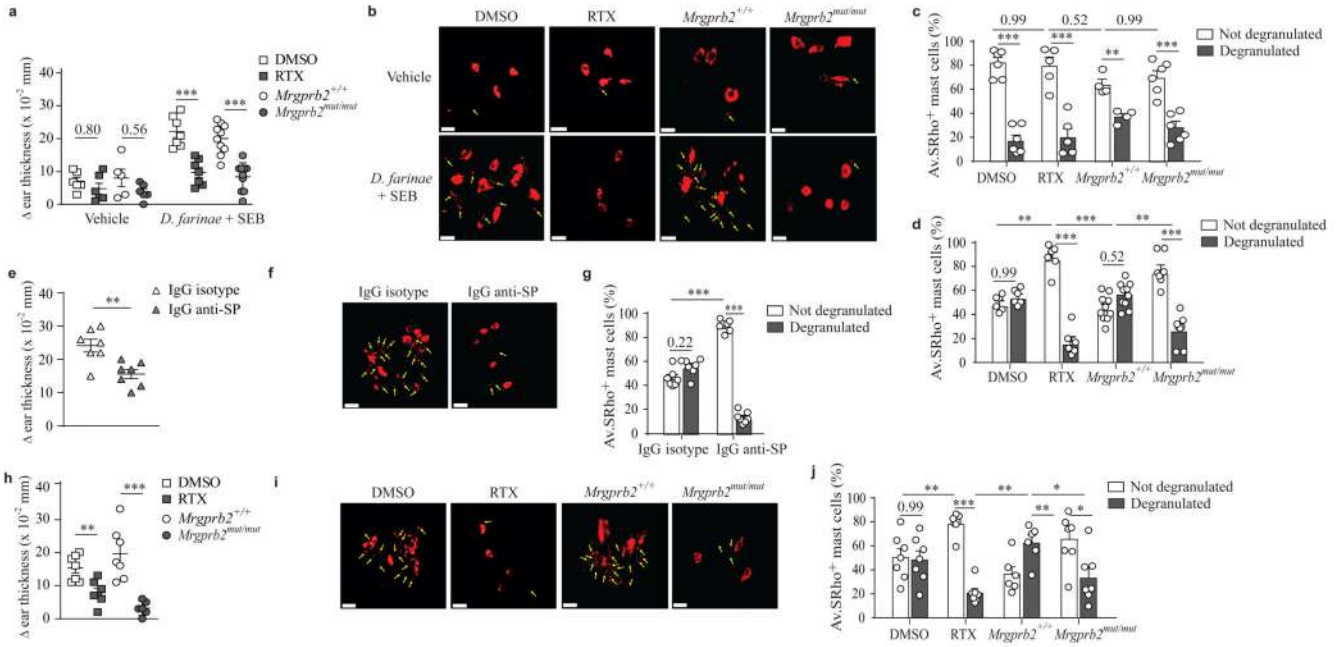


Figure 5. Sensory neurons, MRGPRB2 and substance P are required to trigger *in vivo* mast cell degranulation and associated skin swelling in response to *D. farinae* and SEB antigens.

a, Changes (Δ) in ear thickness 45 minutes after i.d. injection of vehicle or *D. farinae* + SEB in DMSO-treated (open squares), RTX-treated (grey squares), *Mrgprb2*$^{+/+}$ (open circles) or *Mrgprb2*$^{mu/mut}$ (grey circles) mice. **b**, 3D representative confocal microscopy pictures of Av.SRho fluorescent signal (red) in whole-mounted ears in mice treated as in **a**. **c**, Quantification of not degranulated (i.e., lacking exteriorized granules, white bars) or degranulated mast cells (i.e., presence of exteriorized Av.SRho^{+} granule structures, indicated with yellow arrows in **b** and grey bars) in DMSO-treated, RTX-treated, *Mrgprb2*$^{+/+}$ or *Mrgprb2*$^{mu/mut}$ mice 45 minutes after i.d. injection of vehicle. **d**, Same experiment as in **c** but 45 minutes after i.d. injection of *D. farinae* + SEB. **e**, Changes (Δ) in ear thickness 45 minutes after i.d. injection of *D. farinae* + SEB with IgG control isotype (open triangles) or with IgG anti-SP (grey triangles) in WT mice. **f,** 3D representative confocal microscopy pictures of Av.SRho fluorescent signal (red) in whole-mounted ears in mice treated as in **e**. g, Quantification of not degranulated or degranulated mast cells in mice treated as in **e**. **h**, Same experiment as in **a** but 45 after i.d. injection of capsaicin. **i**. Same experiment as in **b** but 45 after i.d. injection of capsaicin. **j**, Same experiment as in **d** but 45 after i.d. injection of capsaicin. Bars = 20 μm. All data are from two independent experiments with the following number of mice: (**a-d**) n = 6 (DMSO Vehicle), n = 5 (RTX Vehicle), n = 5 (*Mrgprb2*$^{+/+}$ Vehicle), n = 6 (*Mrgprb2*$^{mut/mut}$ Vehicle), n = 7 (DMSO *D. farinae* + SEB), n = 7 (RTX *D. farinae* + SEB), n = 9 (*Mrgprb2*$^{+/+}$ *D. farinae* + SEB), n = 9 (*Mrgprb2*$^{mut/mut}$ *D. farinae* + SEB); (**e-g**) n = 7 (IgG control isotype), n = 7 (IgG anti-SP); (**h-j**) n = 7 (DMSO), n = 7 (RTX), n = 7 (*Mrgprb2*$^{+/+}$), n = 7 (*Mrgprb2*$^{mut/mut}$). Mean ± SEM (**a,e,h**), mean + SEM (**c,d,g,j**), two-tailed, unpaired t-test, *P<.05 **P<.01 ***P<.001.

Europe PMC Funders Author Manuscripts
Europe PMC Funders Author Manuscripts

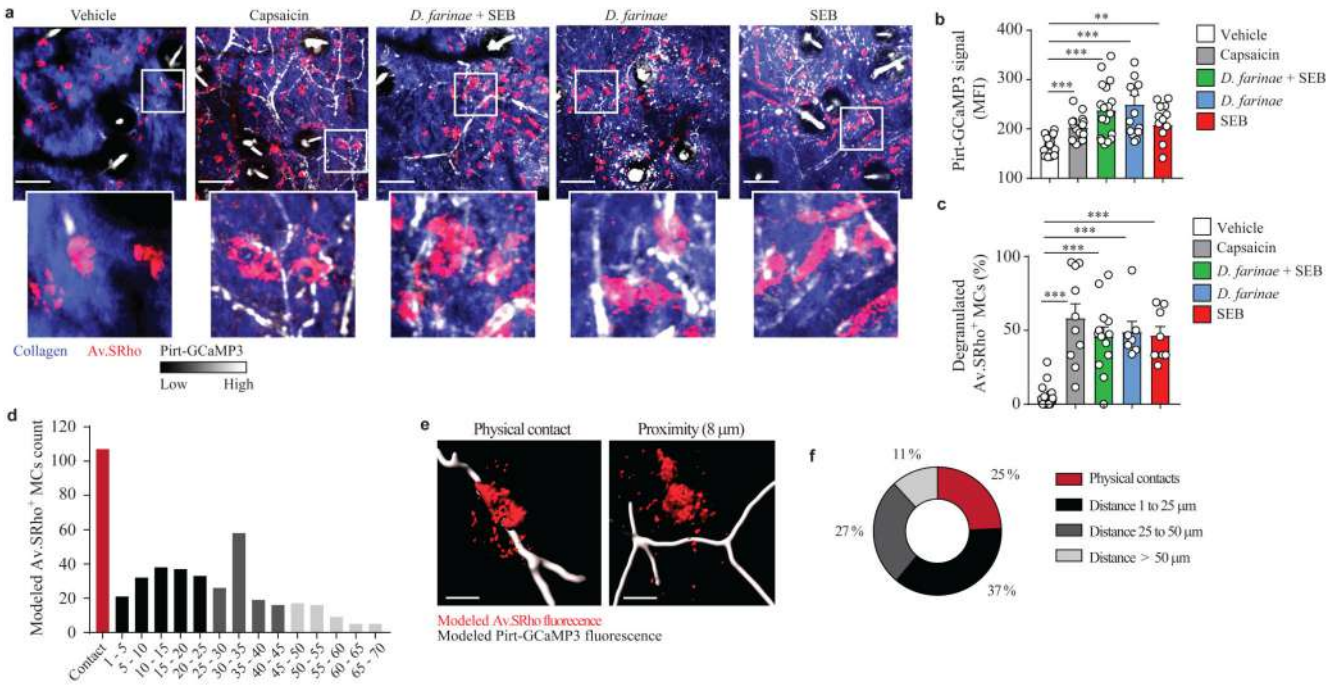


Figure 6. Dermal mast cells and TPRV1$^+$ nociceptors form sensory clusters in the skin that respond to *D. farinae* and SEB.

a, Representative high-resolution 3-D images of the dermis; merged fluorescence of Av.SRho (red), GCaMP3 calcium tracer (pseudocolor intensity scale) and collagen structures (blue) in Av.SRho-labeled ear pinna of Pirt-GCaMP3 mice 30-60 minutes after i.d. injection of vehicle or 1 µM capsaicin or 1 µg *D. farinae* and 50 ng SEB (alone or in combination). White lines identify magnified areas shown in lower images. Bars = 100 µm. **b**, Mean Fluorescence Intensity (MFI) of GCaMP3 fluorescent signal per field of view in mice treated as in **a**. **c**, Proportion (%) of Av.SRho$^+$ mast cells with exteriorized granule structures (i.e., activated to degranulate) per field of view in mice treated as in **a**. One symbol = one field analyzed. (**a-c**) All data are from three independent experiments with the following number of mice: n = 4 (vehicle), n = 5 (capsaicin), n = 5 (*D. farinae*), n = 3 (SEB), n = 5 (*D. farinae* + SEB). Mean + SEM, two-tailed, unpaired *t*-test, **P<.01 ***P<.001. **d**, Automated computational analysis of the minimum distance between modeled Av.SRho$^+$ mast cell bodies detected and modeled capsaicin-activated TRPV1$^+$ Pirt-GCaMP3$^+$ sensory neurons. **e**, Examples of modeled Av.SRho$^+$ mast cell bodies forming physical contact with (left) or in proximity to (right) modeled capsaicin-activated TRPV1$^+$ Pirt-GCaMP3$^+$ sensory neurons. **f**, Proportion (%) of 453 modeled Av.SRho$^+$ mast cell bodies from the ear pinnae of 3 different mice in physical contact with (red), at 1 to 25 µm (black), at 25 to 50 µm (dark grey) or at more than 50 µm (light grey) from modeled capsaicin-activated TRPV1$^+$ Pirt-GCaMP3$^+$ sensory neurons.

Europe PMC Funders Author Manuscripts
Europe PMC Funders Author Manuscripts

USASP
US ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN

PUBLISHED BY
ELSEVIER

The Journal of Pain, Vol 22, No 4 (April), 2021: pp 440–453
Available online at www.jpain.org and www.sciencedirect.com

Analgesic Effects of Topical Amitriptyline in Patients With Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Mechanistic Insights From Studies in Mice

Anne-Laure Genevois,[*,#] Jérôme Ruel,[†,#] Virginie Penalba,[†] Séverine Hatton,[*] Camille Petitfils,[‡] Myriam Ducrocq,[†] Paola Principe,[§] Gilles Dietrich,[‡] Céline Greco,[*,¶,##] and Patrick Delmas[†,##]

[*]*Department of Pain and Palliative Care Unit, Necker Hospital for Sick Children, APHP, Paris, France,* [†]*Cognitive Neuroscience Laboratory, Aix-Marseille University, CNRS, UMR 7291, Marseille, France,* [‡]*IRSD, Toulouse University, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France,* [§]*AlgoTherapeutix, Suresnes, France,* [¶]*Paris-Saclay University, INSERM, UMR-S935, Villejuif, France*

Abstract: **Oral amitriptyline hydrochloride (amitriptyline) is ineffective against some forms of chronic pain and is often associated with dose-limiting adverse events. We evaluated the potential effectiveness of high-dose topical amitriptyline in a preliminary case series of chemotherapy-induced peripheral neuropathy patients and investigated whether local or systemic adverse events associated with the use of amitriptyline were present in these patients. We also investigated the mechanism of action of topically administered amitriptyline in mice. Our case series suggested that topical 10% amitriptyline treatment was associated with pain relief in chemotherapy-induced peripheral neuropathy patients, without the side effects associated with systemic absorption. Topical amitriptyline significantly increased mechanical withdrawal thresholds when applied to the hind paw of mice, and inhibited the firing responses of C-, Aβ- and Aδ-type peripheral nerve fibers in ex vivo skin-saphenous nerve preparations. Whole-cell patch-clamp recordings on cultured sensory neurons revealed that amitriptyline was a potent inhibitor of the main voltage-gated sodium channels (Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9) found in nociceptors. Calcium imaging showed that amitriptyline activated the transient receptor potential cation channel, TRPA1. Our case series indicated that high-dose 10% topical amitriptyline could alleviate neuropathic pain without adverse local or systemic effects. This analgesic action appeared to be mediated through local inhibition of voltage-gated sodium channels.**

Perspective: ***Our preliminary case series suggested that topical amitriptyline could provide effective pain relief for chemotherapy-induced peripheral neuropathy patients without any systemic or local adverse events. Investigation of the mechanism of this analgesic action in mice revealed that this activity was mediated through local inhibition of nociceptor Nav channels.***

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Inc. on behalf of United States Association for the Study of Pain, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Key Words: *Amitriptyline, chemotherapy-induced peripheral neuropathy, analgesics, topical administration, voltage-gated sodium channels, nociceptive sensory neurons, transient receptor potential ankyrin 1, nociceptors; Nav1.8, Nav1.7 and Nav1.9 isoforms.*

Received July 1, 2020; Revised October 15, 2020; Accepted November 3, 2020.

[#]Joint first authors.

[##]G.C. and P.D. contributed equally to this work and wish to be recognized as joint last authors of this manuscript.

Funding sources: Part of the study was sponsored by AlgoTherapeutix.

Role of the sponsor: AlgoTherapeutix developed the protocols in conjunction with the clinical and preclinical investigators and provided the study drug. The sponsor had no role in the conduct of the study, the collection, analysis and interpretation of the results.

Conflicts of interest: C.G. is one of the holders of the patent related to repurposing amitriptyline for use in chemotherapy-induced neuropathic pain. P.P. was an employee of AlgoTherapeutix during the execution of the reported study. The other authors have no conflicts of interest to declare.

Address reprint requests to Céline Greco, MD, PhD, Department of Pain and Palliative Care Unit, Necker Hospital for Sick Children, APHP, 149 Rue de Sèvres, 75015, Paris, France. E-mail: celine.greco@aphp.fr, celine.greco@inserm.fr

1526-5900/$36.00

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Inc. on behalf of United States Association for the Study of Pain, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

https://doi.org/10.1016/j.jpain.2020.11.002

Antidepressants are an essential component of the therapeutic strategy for treatment of many causes of persistent pain.[15, 49] Tricyclic antidepressants are the recommended first-line treatment for many forms of persistent neuropathic pain.[11,15,22] Amitriptyline hydrochloride (amitriptyline), a tricyclic antidepressant approved for the treatment of major depression, has been shown to be effective for the treatment of pain associated with a range of neuropathic pain conditions, including diabetic neuropathy, fibromyalgia and postherpetic neuralgia.[19,25,27] However, many patients are unable to achieve optimal pain relief with oral amitriptyline due to the occurrence of dose-limiting intolerable adverse events (AEs), including somnolence, anticholinergic effects and cardiotoxicity.[10,11,15]

As a potential alternative, 2 anecdotal case reports have indicated that topical administration of high-dose (10%) amitriptyline in creams may provide effective treatment for neuropathic pain, potentially allowing optimal treatment doses to be achieved while minimizing the risk of systemic AEs.[35,36] In particular, encouraging results have been reported with 10% topical amitriptyline in a pilot study of patients presenting with hand and foot chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN).[46]

At present, the precise mechanisms underlying the analgesic effects of amitriptyline remain unclear. A potential mechanism may involve reinforcement of the descending inhibitory pain pathways by the accumulation of norepinephrine and serotonin in central synapses, resulting in suppression of ascending pain messages in the spinal cord.[43] Amitriptyline also displays a range of other pharmacological activities that may contribute to its analgesic properties. Amitriptyline is an antagonist of the histamine, muscarinic, adrenergic, and serotonin receptors, and leads to blockade of voltage-gated sodium ion channels.[30,41] It also appears to interact with calcium ion channels.[37] Indirect studies using the forced swim test as a model of depressive-like behavior in rodents,[1,45] and functional assays in rat dorsal root ganglia (DRG) cell cultures,[44] have indicated that amitriptyline may also modulate members of the transient receptor potential (TRP) cation channel family. Dysregulation of Nav channels and TRP channels, such as TRP vanilloid 1 (TRPV1) and TRP ankyrin 1 (TRPA1), has been implicated in the pathophysiology of neuropathic pain,[8,14] including that of CIPN. Both sodium and TRP channels are viewed as therapeutic targets for the development of new neuropathic pain treatments.[52,56] Although many investigators have demonstrated the inhibitory effects of antidepressants on Nav channels as a possible mechanism of analgesia,[18] studies on the effects of amitriptyline on the activities of the TRP channels are limited and, to our knowledge, no one has tested whether amitriptyline applied to the skin improves pain by alleviating its peripheral somatosensory component.

Thus, we first investigated the potential effectiveness of topically applied 10% amitriptyline in a preliminary, uncontrolled, observational case series of patients with CIPN and assessed whether there were any local AEs, or AEs associated with systemic absorption of amitriptyline in these patients. We then aimed to gain insight into the mechanisms involved in the analgesic activity of topically applied amitriptyline by using experimental approaches in mice to assess the effects of amitriptyline on the nociceptive withdrawal threshold of hind paws, nociceptive afferent messages, TRP channel-mediated calcium ion mobilization, and Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9 channel activity.

Methods

Patient Case Series

Adult and pediatric patients with CIPN of the hands and/or feet were recruited after being referred to the pain management department at the Necker Hospital (Paris, France) by their oncologist or hematologist. Patients referred for severe CIPN that persisted after completion of anticancer therapy, and patients referred while still undergoing therapy were eligible for the study. For the patients still undergoing anticancer treatment, the aim of the referral was to determine if their CIPN could be managed before making any decisions to change or reduce the dose of their anticancer therapy.

Patients with open lesions on the hands or feet, and those with dementia or who were incapable of applying the cream themselves, were not eligible. This study was conducted within the framework of the ongoing management of the patients. Patients were informed of the aims of the study, the fact that any benefits of the treatment may not be observed before 1 month of use, and that the risk of systemic side effects was expected to be much lower than that associated with oral amitriptyline. Patients were also informed of the risk of skin irritation at application sites, and of safety issues regarding the need to avoid ingesting the cream and to prevent the cream from coming into contact with the eyes. All patients gave oral consent before being included in the study. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hôpitaux Universitaires Paris-Ouest (HUPO) and by the French Data Protection Authority (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, CNIL).

Patients were instructed to apply 1 g (obtained using a measuring device) of 10% amitriptyline hydrochloride cream (oil-in-water emulsion), twice a day to each area with pain sensations such as burning, numbness, and tingling. Thus, the total amount of cream used per day varied between 2 and 4 g depending on the number of extremities (hands and/or feet) affected. Patients were told to apply the cream thinly and to rub it in gently, and to wait 30 minutes before handwashing. There was no need for foot washing after application of the cream. No other new or existing analgesics or other pain-relieving nonpharmacologic therapies (such as acupuncture, cryotherapy etc.) were to be used during the study period.

Neuropathic pain was assessed before and after 1 month of treatment using a validated scale from the *Douleur neuropathique en 4 question*s (DN4, neuropathic pain in 4 questions) questionnaire.[51] Pain intensity was assessed at day 7, day 15 and month 1, using the Numeric Pain Rating Scale (NPRS[32]). Patients were also asked to report any local or systemic AEs at each visit.

Laboratory Animals

The mice used in this study were bred and housed in accredited facilities; they were adult males, 6 to 12 weeks old, and from a C57Bl/6J background. The animals were kept in standard laboratory conditions with 12-hour light/dark periods at a temperature of 22 $\pm$ 2°C and supplied with dry food and drinking water *ad libitum*. All animals were handled in compliance with the European Community guidelines for the care and use of animals (2010/63/EEC). Since pain might occur in these experiments, the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain[62] were followed. Furthermore, all procedures were approved by the institutional review board of the regional ethics committee (Région PACA).

Assessment of the Nociceptive Withdrawal Threshold in Mice Using the Randall-Selitto Test

The nociceptive withdrawal threshold was assessed using a Randall-Selitto electronic algesimeter (Ugo Basil, Italy) following a protocol similar to that described by Santos-Nogueira et al 2012.[48] During the test, the animal was placed into a pouch that provided access to the right hind paw (test paw). They were then carefully immobilized with the same hand used to hold the test paw. The test consisted of the application of an increasing mechanical force, in which pressure was applied onto the dorsal surface of the right hind paw. The mechanical threshold was defined as the force (in grams) at which the mouse withdrew its paw from the device. The cut-off value was fixed at 250 g in order to protect the paw from possible tissue damage. Mice were habituated during the four days before the test to get used to the manipulation.

The nociceptive withdrawal threshold was measured before and 5 minutes after the application of a control cream (Excipial hydrocreme) or a cream containing 10% amitriptyline to the test area (ie, the right hind paw). Creams were applied by an investigator wearing gloves, using their index finger to gently rub 300 μL of cream (approximately 30 μg of amitriptyline) over the dorsal surface of the test area for 5 minutes. Animals were randomly assigned to the treatment groups (n = 8 for each group) and measurements were made blind, that is, the investigator was not aware of the nature of the cream that had been applied. Each reported data point represents the mean of three consecutive measurements taken at 5-minute intervals.

Ex Vivo Single-Unit Recordings From Mouse Skin-Nerve Preparations

Adult male mice were anesthetized with isoflurane (4%) and sacrificed by severing of the carotid arteries. Skin-saphenous nerve preparations and single-fiber recordings were carried out according to the method described by Zimmerman et al (2009).[61] The saphenous nerve and the skin of the hind limb were carefully dissected and placed in a custom-designed organ chamber containing warm oxygenated synthetic interstitial fluid (SIF). The SIF buffer had the following composition (in mM): 120 NaCl, 3.5 KCl, 0.7 $MgSO_4$, 1.7 NaH_2PO4, 5 Na_2HCO_3, 2 $CaCl_2$, 9.5 Na-Gluconate, 5.5 glucose, 7.5 sucrose, and 10 HEPES. The pH was set to 7.4 and the osmolarity was maintained at 300 mOsm/L. The skin was placed corium side up in the organ bath, continuously superfused with SIF buffer and maintained at a temperature of 31°C using a CL-100 temperature controller (Harvard Apparatus; Warner Instruments, Holliston, MA).

The saphenous nerve was placed in an adjacent recording chamber filled with mineral oil, gently teased, and groups of nerve fibers were placed on a gold recording electrode in order to isolate single-unit activity. Extracellular action potentials from single nerve fibers were recorded with a DAM 80 AC differential amplifier (WPI) and digital outputs were acquired using the CED Spike2 system (sampling rate of 20 kHz; Cambridge Electronic Design Limited, UK). Spikes were discriminated off-line using the Spike2 software (Cambridge Electronic Design Limited, UK) and analyzed individually to avoid false positives. The mechanically evoked activity of single saphenous nerve fibers was first obtained in response to von Frey hair stimulations (Friedrich-Alexander University, Erlangen, Germany). Once a receptive field had been characterized, a patch of skin was isolated from the surrounding bath using a plastic minichamber (inner diameter: .8 cm) continuously superfused with buffer at 31°C. The receptive field was then stimulated using von Frey mechanical probes mounted on the arm of a computer-controlled piezoelectric stepper (E-861 NEXACT controller; PI, Germany). Conduction velocity was determined by electrically stimulating (Tungsten microelectrode: 10 mm ext/60 mm PI; FHC) identified receptive fields with square wave pulses (.1−.5 ms, 7−15 V). Classically, axons are considered to be A-type when the conduction velocity is over 1 to 2 m/s.[60] However, to avoid ambiguity, axons in our study were only considered to be A-type when the conduction velocity was at least 4 m/s. Fibers with a conduction velocity below 1 m/s were classified as C fibers.

Recordings of mechanically induced firing of sensory fibers were carried out in the absence of amitriptyline (control) and after superfusion of the skin preparation with amitriptyline for at least 10 minutes and after a

30-minute washout. The amitriptyline was prepared as stock solutions in water and stored at −4°C until use. It was freshly prepared before each experiment and diluted to working concentrations in the SIF buffer. Dose-response was obtained by measuring firing activity after skin superfusion with increasing concentrations of amitriptyline (10−100 μM).

Culture of Mouse DRG Neurons

Cultures of DRG were prepared from male mice anesthetized with isoflurane (4%, Piramal Critical Care) and sacrificed by severing of the carotid arteries. Cultures of dissociated DRG neurons were established from thoracolumbar DRG as described previously.[26]

DRG for whole-cell patch-clamp recordings were incubated in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen, France) containing 2 mg/mL of collagenase IA (Sigma, France) for approximately 45 minutes at 37°C. DRG were washed at least 10 times and then triturated with a fired polished glass Pasteur pipette. Dissociated DRG neurons were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 50 U/mL penicillin-streptomycin, 2 mM L-glutamine, 25 mM glucose, 25 ng/mL nerve growth factor, and 2 ng/mL glial-derived neurotrophic factor (Invitrogen).

For calcium mobilization measurements, 10 DRG cultures (2 mice per culture) were washed with HBSS (Thermo Fisher Scientific, MA), and incubated in HBSS containing 1 μg/mL papain (Sigma Aldrich, MO) and L-cysteine (pH 7.4, Sigma Aldrich) for 10 minutes at 37°C. DRG were rinsed in Leibovitz's L-15 Medium (Thermo Fisher Scientific) containing 1% penicillin–streptomycin and 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific) and digested twice with 4 mg/mL dispase II (Sigma Aldrich) and 1 mg/mL collagenase type I (Sigma Aldrich) for 10 minutes at 37°C. Neurons were then mechanically dissociated. After centrifugation at 50 g, neurons were plated into an eight-well Nunc Lab-Tek II CC2 Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific) in DMEM containing 3% FBS, 1% penicillin-streptomycin and 10 μM of a cocktail of mitosis inhibitors including cytosine-β-D-arabinofuranoside, 5-fluorouracil, and uridine (Sigma Aldrich) for 24 hours.

Transient Transfection of HEK293T Cells With hNav1.7 cDNA

Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells were grown in DMEM containing 4.5 mg/mL glucose, 10% FBS, 50 U/mL penicillin and 50 μg/mL streptomycin. Cells were plated onto 12-mm round glass poly-D-lysine-coated coverslips placed in 24-well plates and transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. hNav1.7 and GFP plasmids were co-transfected at a concentration of 600 and 100 ng/mL, respectively. Experiments were conducted on cells 24 to 48 hours post-transfection.

Whole-Cell Patch-Clamp Recordings of Sodium Currents in DRG Neurons and Transfected Human Embryonic Kidney Cells

Patch-clamp recordings were made using borosilicate electrodes (Harvard Apparatus; Warner Instruments, Holliston, MA) with a resistance of 2 to 3 MΩ when filled with an intracellular solution consisting of (in mM): 130 CsCl, 10 Hepes, 8 NaCl, 0.4 NaGTP, 4 MgATP, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, and 10 EGTA (adjusted to pH 7.3 with CsOH, ~300 mOsm/L). The bath solution had a lower concentration of sodium (in mM): 60 NaCl, 110 Sucrose, 3 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.35, 300 mOsm/L). Voltage-gated sodium ion currents were leak-subtracted using a P/6 protocol and voltage errors were minimized using 75 to 80% series resistance compensation. Cultured cells were perfused with the bath solution at a flow rate of 5 mL/min. Recordings were made at room temperature (20−24°C) using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Boston, MA), filtered at 1 to 2 kHz, and digitally sampled at 5 to 20 kHz.

Sodium currents were recorded individually. To record the tetrodotoxin (TTX)-resistant Nav1.8 and Nav1.9 currents in relative isolation, DRG neurons were bathed in a standard bath solution containing 300 nM TTX (to block TTX-sensitive Na^+ currents) and 50 μM La^{3+} and 1 mM amiloride (to block voltage-activated Ca^{2+} currents).[12] The Nav1.8 current was recorded in Nav1.9$^{-/-}$ DRG neurons, whereas the Nav1.9 current was recorded in Nav1.8$^{-/-}$ DRG neurons. Nav1.8$^{-/-}$ and Nav1.9$^{-/-}$ mice were generated from a C57Bl/6J background as previously described by Bonnet et al.[9] Fast activating/inactivating TTX-sensitive Na^+ currents (Nav1.1 and Nav1.6) in putative non-nociceptors were recorded in wild-type DRG neurons that had large cell membrane capacitance (Cm >60 pF) and lacked any TTX-resistant Na^+ current components. Nav1.7 recordings were made using the transfected HEK cells. All Na^+ currents were recorded before and after cumulative addition of amitriptyline (1 μM−1 mM).

Treatment of Dorsal Root Ganglion Neurons for Measurements of Calcium Mobilization

DRG neurons were incubated with HBSS containing 20 mM Hepes, 1 mM fluo-4 acetoxymethyl ester (Thermo Fisher Scientific) and .02% pluronic acid for 30 minutes at 37°C followed by an additional incubation for 30 minutes at room temperature. The medium was then discarded and replaced by HBSS. Calcium mobilization in the DRG neurons was measured in response to increasing concentrations of amitriptyline (.01−1 mM) to obtain a dose-response curve. The effects of TRP channel agonists and antagonists on amitriptyline-induced calcium ion mobilization were then assessed as follows: neurons were incubated with either an antagonist for TRPV1 (10 μM AMG 9810, Sigma Aldrich) or an antagonist for TRPA1 (HCO30031; Sigma Aldrich), or with the vehicle (.001% DMSO HBSS) for 5 minutes

before adding increasing amounts of amitriptyline or an agonist either for TRPV1 (62 nM capsaicin, Sigma Aldrich) or for TRPA1 (50 μM allyl isothiocyanate, AITC; Sigma Aldrich).

Calcium Imaging

Neurons were imaged using an inverted microscope (Zeiss) and a 10 $\times$ .5 NA objective. Images were acquired using a CCD camera (Zeiss) and Zen software (Zeiss). Acquisition parameters were kept constant during each experiment. Kinetic analysis was performed using 85 recordings (one per second). Baseline fluorescence was determined for 0 to 10 seconds, and then fluorescence was measured from the 10th to the 65th second after the neurons were incubated with the drugs or controls. At 65 seconds, 50 mM KCl was added to the cells in order to allow discrimination between neurons and glial cells. Variations in fluorescence intensity measured in each neuron were identified using Image J2 software.

Statistics

Data are presented as numbers and percentages, or means $\pm$ the standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). Depending on the sample size, statistical analyses were performed using the paired two-tailed t-test, the Kruskal-Wallis test (with subsequent Dunn's multiple comparison tests) or the Wilcoxon test as appropriate. Differences were considered significant if $P < .05$.

Results

Effectiveness of 10% Amitriptyline Hydrochloride Cream in Patients With Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy

In total, 25 patients (23 adults, and 2 children aged 8 and 12 years) with CIPN of the hands (n = 1, 4%), feet (n = 9, 36%), or hands and feet (n = 15, 60%) were included in the case series and treated for 1 month with a cream containing 10% amitriptyline. Among the 25 patients, 7 were referred for onset of CIPN while responding well to ongoing anticancer treatment. The remaining 18 patients were cancer survivors who had long-standing CIPN that persisted after they had completed their chemotherapy. The baseline demographic and clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. The most common neuropathic chemotherapeutic agents were bortezomib (n = 6; 24%), oxaliplatin (n = 4, 16%), and taxanes (n = 4, 16%).

All the patients were experiencing severe pain at baseline with a mean NPRS score of 7/10 and a mean DN4 score of 6/10 (Table 2). After the 1-month treatment with topical amitriptyline, the mean DN4 score had decreased to 3/10 (Table 2 and Fig 1A; $P < .001$). In addition, reported mean pain intensity decreased from severe at baseline to mild after the 1-month treatment (NPRS score: 3: Table 2 and Fig 1B; $P < .001$). Large improvements in pain scores were observed in association with the topical amitriptyline treatment for the 7 patients with CIPN whose anticancer therapy was ongoing, and these patients were able to continue their effective cancer treatment without any changes to the dose or regimen being needed.

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of Patients at Baseline

Demographic and Clinical Characteristics	*Patients N = 25*
Gender, n (%)	
Male	10 (40)
Female	15 (60)
Age (y)	
Mean $\pm$ SD	58 $\pm$ 18.3
Median (min–max)	63 (8–82)
Primary disease, n (%)	
Lymphoma	5 (20)
Myeloma	7 (28)
Breast cancer	6 (24)
Colon/rectum cancer	3 (12)
Leukemia	2 (8)
Sinus cancer	1 (4)
Rhabdomyosarcoma	1 (4)
Neurotoxic agent, n (%)	
Bortezomib	6 (24)
Oxaliplatin	4 (16)
Vincristine	4 (16)
Taxanes	4 (16)
Trastuzumab emtansine	2 (8)
Cisplatin	1 (4)
Cyclophosphamide	1 (4)
Doxorubicin	1 (4)
Lenalidomide	1 (4)
Vindesine	1 (4)
Time to CIPN onset (d)	
Mean $\pm$ SD	106 $\pm$ 94.0
Median (min–max)	90 (1–365)*
Duration of CIPN before treatment (mo)	
Mean $\pm$ SD	18 $\pm$ 32.4
Median (min–max)	3 (0–120)
Area affected by CIPN, n (%)	
Feet	9 (36)
Hands	1 (4)
Hands and feet	15 (60)

Abbreviations: SD, standard deviation; CIPN, chemotherapy-induced peripheral neuropathy.
*Two patients had onset of CIPN on the same day as receiving their first chemotherapy treatment (day 1).

Table 2. Pain Scores at Baseline and After 1 Month of Treatment

Pain Scores	*Baseline N = 25*	*1 m N = 25*
DN4 score (0–10)		
Mean $\pm$ SD	6 $\pm$ 1.6	3 $\pm$ 1.8
Median (min–max)	6 (4–9)	2 (0–7)
NPRS score (0–10)		
Mean $\pm$ SD	7 $\pm$ 2.0	3 $\pm$ 2.1
Median (min–max)	8 (3–10)	2 (0–7)

Abbreviations: DN4, *Douleur Neuropathique 4 Questions* (Neuropathic pain in 4 questions); NPRS, Numeric Pain Rating Scale; SD, standard deviation.

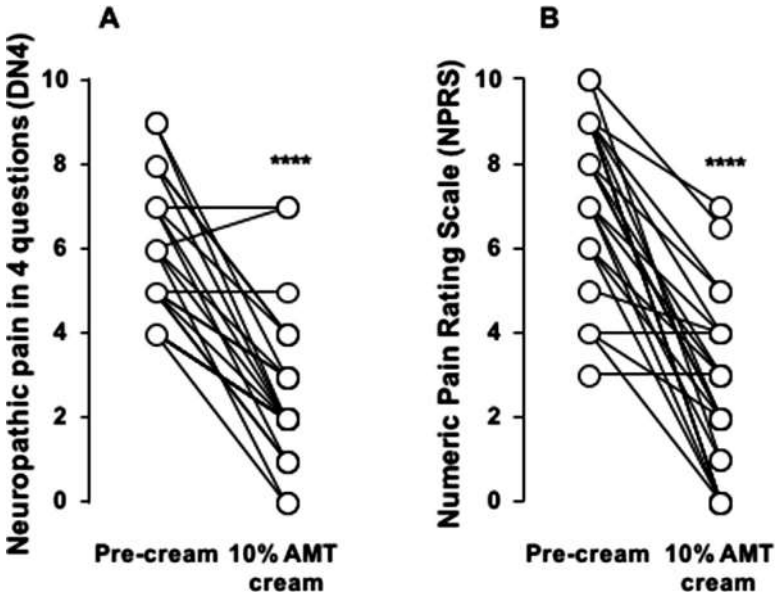


Figure 1. Chemotherapy-induced hand and/or foot pain is alleviated by local 10% amitriptyline application. Twenty-five patients with chemotherapy-induced neuropathic pain were treated with 10% amitriptyline hydrochloride cream, applied twice a day to each area with pain, for 1 month. Pain was assessed before and 1 month after treatment using both the Neuropathic pain in 4 questions (Douleur Neuropathique 4 Questions; DN4) questionnaire (**A**) and the Numeric Pain Rating Scale (**B**). Circles represent patient scores and each line represents one patient. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon matched pairs test. ****$P < .0001$.

No local AEs (such as skin irritation), nor any of the frequent systemic AEs associated with oral amitriptyline use (notably xerostomia, dizziness, or somnolence) were reported following application of the cream by the patients in our case series.

Amitriptyline Administered Topically to the Skin Increases the Nociceptive Withdrawal Threshold in Mice

We tested whether a cream containing 10% amitriptyline had analgesic/antinociceptive effects on the response thresholds to mechanical pressure stimulation in mice using the Randall-Selitto test with an electronic algesimeter. The nociceptive withdrawal threshold was assessed before and after a 5-minute gentle massage with a control cream or a cream containing 10% amitriptyline. No difference in nociceptive withdrawal threshold was observed following treatment with the control cream (Fig 2A), whereas paw surfaces were significantly less sensitive to noxious stimuli following application of the 10% amitriptyline cream (Fig 2B), with the mean nociceptive threshold value increasing by approximately 12% following application of the 10% amitriptyline cream.

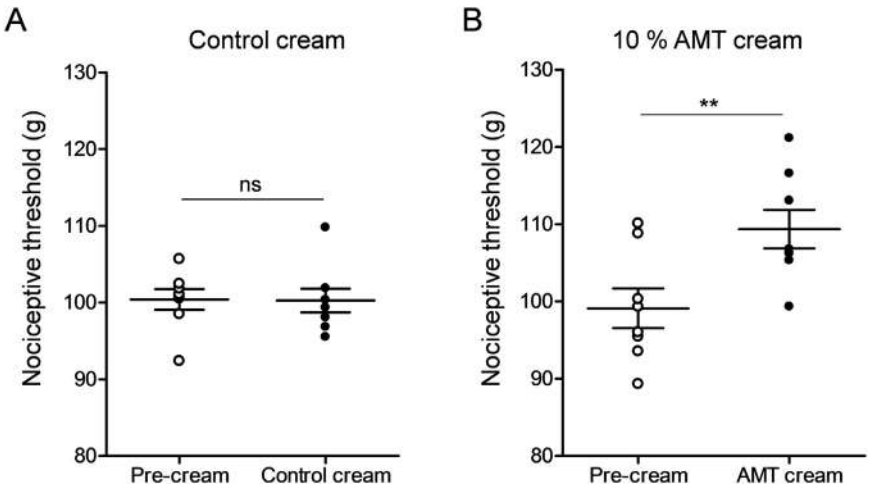


Figure 2. Effects of a single, 5-minute skin application of a cream containing 10% amitriptyline on the nociceptive withdrawal threshold in mice. Nociceptive withdrawal thresholds were measured using a Randall-Selitto electronic algesimeter. Values were obtained for individual mice before and 5 minutes after application of a control cream (**A**) or a 10% amitriptyline (AMT) cream (**B**). Data are the means ± SEM of measurements conducted in triplicate on 8 mice from each group. ns, not significant; **$P < .01$, Wilcoxon test.

Amitriptyline Inhibits the Activities of Both Nociceptive and Nonnociceptive Nerve Fibers in Skin-Nerve Preparations

The effects of amitriptyline on nerve fibers were evaluated by recording single-unit activity from skin-saphenous nerve preparations from adult mice (Fig 3). Low-threshold Aβ mechanoreceptors were identified as showing low mechanical thresholds ($\leq$1 mN, n = 6) with high conduction velocities (>20 m/s) and were identified as slowly adapting based on responses to constant force mechanical stimuli. C-type mechanonociceptive fibers were recognized as displaying high mechanical thresholds (range = 11−32 mN, n = 13) with low conduction velocities ($\leq$1 m/s) and tonic activity. Aδ mechanonociceptive fibers were identified by their very high mechanical thresholds (>80 mN, n = 6) and relatively high conduction velocities (3−14 m/s).

Exposure of the receptive field of both C-type mechanonociceptors and of low-threshold Aβ mechanoreceptors to 100 μM amitriptyline inhibited mechanically induced firing (Fig. 3A and 3B). Mean inhibition of evoked firing after a 10-minute application of 100-μM amitriptyline to the skin preparation was 95.6%, 87.5% and 82.5% in C, Aδ and Aβ fibers, respectively (Fig 3C). Amitriptyline inhibition was dose-dependent with IC_{50} values of 15, 16 and 26 μM for C, Aδ and Aβ fibers, respectively (Fig 4) and reversible within 30 to 35 minutes of washout.

Amitriptyline Inhibits Sodium Ion Channels in Sensory Neurons With Greater Potency Towards Nociceptor Channel Isoforms

We investigated the effects of amitriptyline on Nav channels in sensory neurons from mouse DRG neurons recorded using the patch-clamp technique. Nav channels including the Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9 isoforms are key to nociception, whereas other TTX-S Nav channel isoforms (Nav1.1 and Nav1.6) transmit non-noxious information[29] We found that amitriptyline applied at increasing concentrations inhibited these channels (Fig 5). Inhibition by 100-μM amitriptyline was typically reversible within 20 $\pm$ 2 minutes. Plotting the inhibitory effect versus amitriptyline concentration (Fig 6A) yielded IC_{50} values of 4.25 $\pm$ .4, 6.97 $\pm$ .3, and 15.6 $\pm$ .5μM for Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9, respectively (Fig 6B). Amitriptyline was 10-fold less potent (62 $\pm$ .5 μM) at inhibiting TTX-S Nav currents of touch mechanoreceptors than the Nav1.8, Nav1.7, and Nav1.9 currents of nociceptive neurons (Fig 6B).

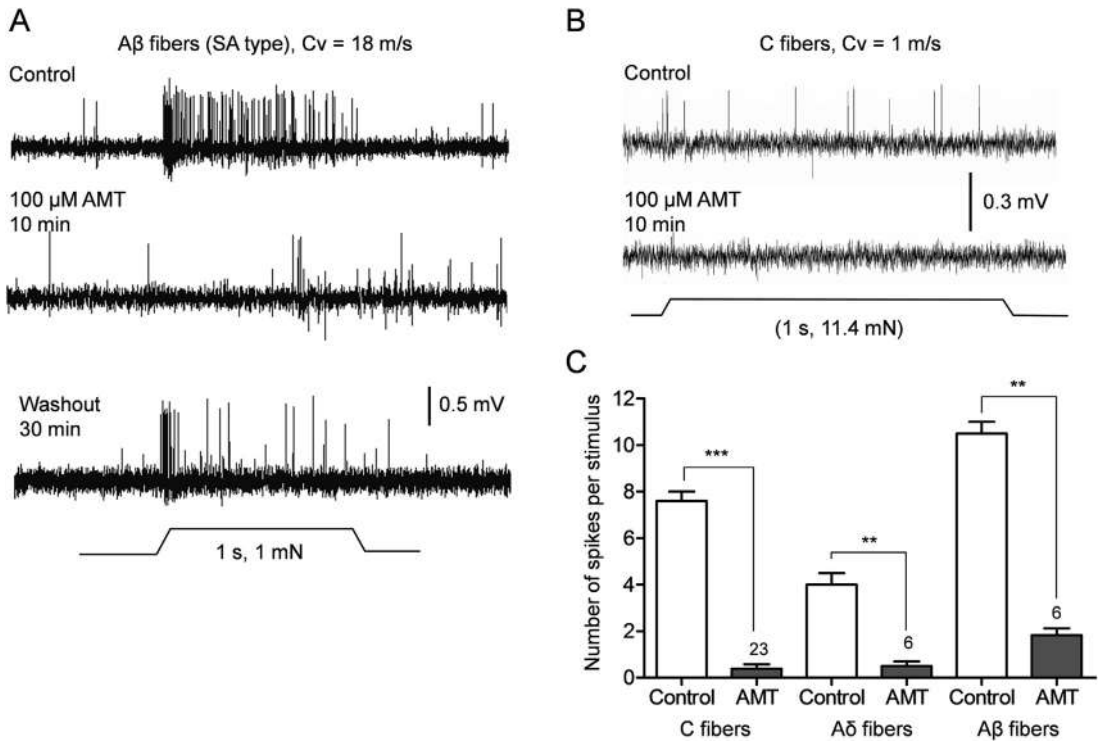


Figure 3. Amitriptyline applied to skin preparations reduces the mechanically induced activities of sensory fibers from the saphenous nerve. **(A)** Discharge of a low-threshold Aβ (slow-adapting) mechanoreceptor in response to a 1 mN mechanical stimulus applied to the surface of the skin in the absence of amitriptyline (control), and after 10 minutes of skin superfusion with amitriptyline (100 μM). Note that inhibition was not complete and partially reversed after a 30-minute washout of amitriptyline. **(B)** Firing in a C-type mechanonociceptor fiber in response to 11.4 mN mechanical stimulation in the absence of amitriptyline (control), and full inhibition after 10 minutes of superfusion of the receptive field with amitriptyline (100 μM). Data presented are representative of 6 and 13 Aβ- and C-type fiber recordings, respectively. **(C)** Mean firing discharge of C, Aδ and Aβ sensory fibers before and after 10 minutes of skin superfusion with 100 μM amitriptyline. The number of recordings is indicated. Recordings for the C, Aδ and Aβ fibers were conducted using 7 skin-saphenous nerve preparations from 7 mice. Data are expressed as means $\pm$ SEM. AMT, amitriptyline; SA, slow-adapting; Cv, conduction velocity; $^{**}P < .01$, Wilcoxon test $^{***}P < .001$, paired two-tailed t-test.

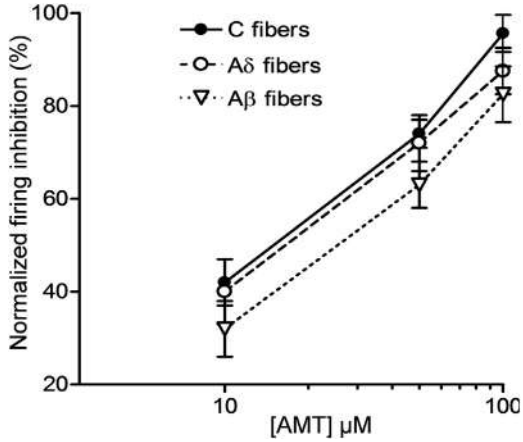


Figure 4. Nociceptive C and Aδ fibers are more susceptible to amitriptyline block than low-threshold Aβ fibers. Dose-dependent effect of amitriptyline (AMT) on firing responses of single saphenous C, Aδ and Aβ sensory fibers (n = 5 for each concentration). Each bar represents the mean inhibition expressed as a percentage of the control response. Approximate IC_{50} values were 15, 16, and 26 μM for C, Aδ and Aβ sensory fibers, respectively.

Amitriptyline Activates Dorsal Root Ganglion Neurons Through TRPA1 Channels

The effect of amitriptyline on calcium ion mobilization was investigated in primary cultures of mouse DRG neurons. Exposure to amitriptyline led to increases in the concentration of intracellular calcium ions within 10 seconds (Fig 7A) and this effect was dose-dependent with an IC_{50} of .05 mM (Fig 7B). The intracellular calcium ion amplitude curve reached a plateau after around 20 seconds of amitriptyline exposure (Fig 7A), indicating that the response was associated with calcium ion channel opening. We therefore assessed whether amitriptyline-induced calcium ion mobilization was dependent on amitriptyline binding to TRPV1 or TRPA1 by pretreating the cells with antagonists of these receptors. Pretreatment of the DRG neurons with an excess of TRPA1 antagonist (HC30301) led to inhibition of amitriptyline-induced calcium ion mobilization (Fig 7C). In contrast, the pretreatment of neurons with an antagonist for TRPV1 (AMG9810) had no effect (Fig 7C). We then assessed the ability of amitriptyline to facilitate the response of DRG neurons to stimulation. Addition of suboptimal doses of amitriptyline did not potentiate the activation of the DRG neurons induced by either a TRPV1 agonist (capsaicin) or a TRPA1 agonist (AITC) (Fig 7D).

Discussion

Our preliminary case series suggested that a 1-month topical treatment with 10% amitriptyline could lead to pain relief in a series of patients with CIPN, without any

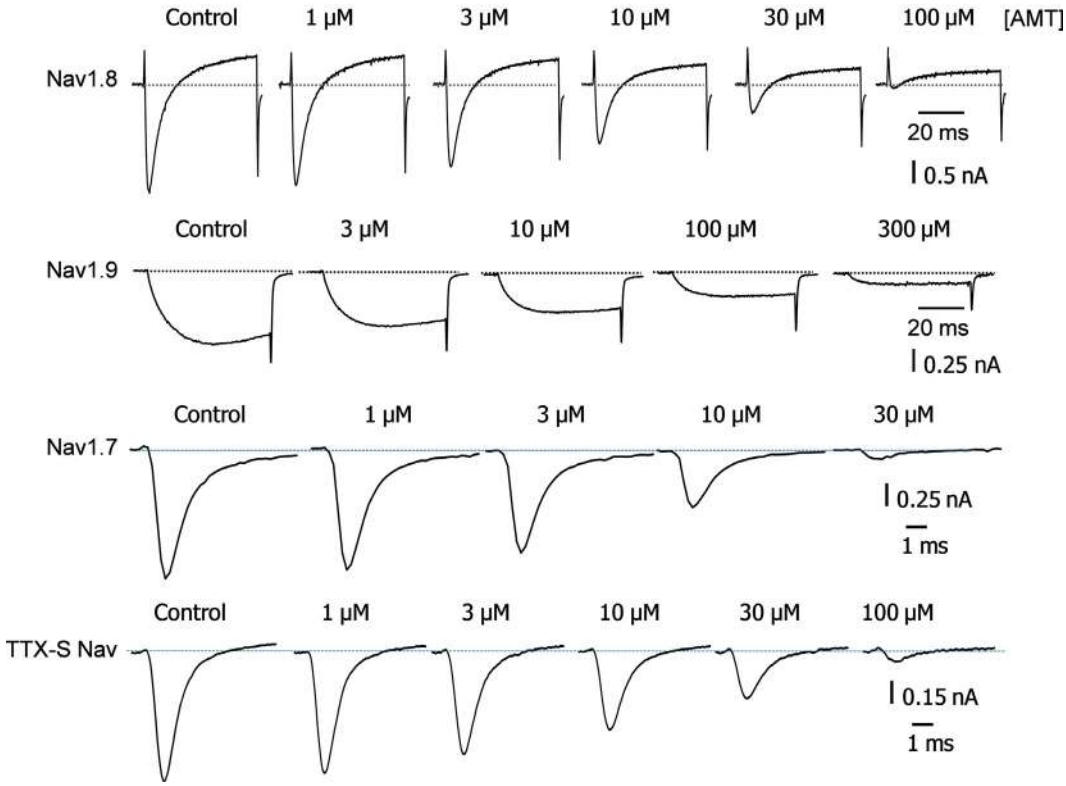


Figure 5. Amitriptyline inhibits all sodium channel isoforms from sensory neurons. Effect of cumulative application of amitriptyline (AMT) on the current through Nav channels expressed in nociceptors (Nav1.8, Nav1.9, and Nav1.7) and the tetrodotoxin (TTX)-sensitive fast activating/inactivating Nav channels (TTX-S: mixture of Nav1.2 and Nav1.6) expressed in non-nociceptive (large diameter) sensory neurons. Currents were elicited by voltage steps from a holding potential of −100 mV (Nav1.8 and Nav1.9) or −80 mV (Nav1.7 and TTX-S Nav). Nav1.9 current was recorded in Nav1.8$^{-/-}$ DRG neurons, whereas Nav1.7 was recorded in hNav1.7-expressing human embryonic kidney cells. Data presented are representative of the recordings from 7 measurements, except for the Nav1.9 current (n = 5).

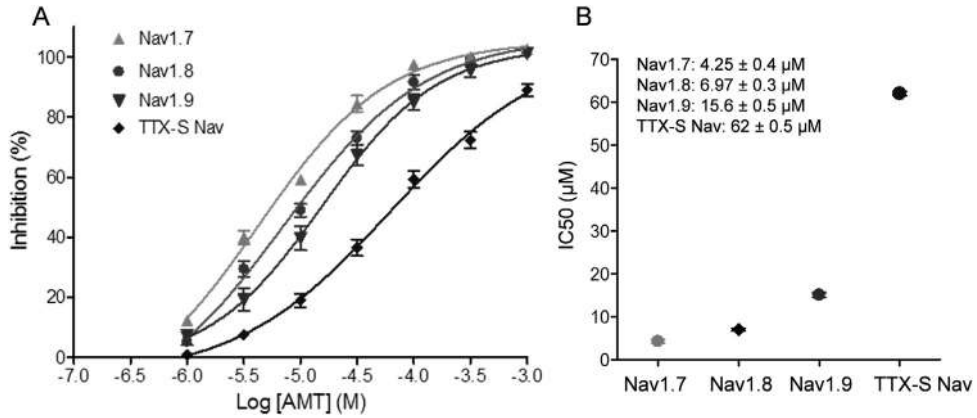


Figure 6. Amitriptyline shows a 10-fold potency for Nav1.8 and Nav1.7 over Nav1.1 and Nav1.6. (**A**) Dose-response curves for amitriptyline (AMT) block of Nav currents. Dose-response curves were obtained by plotting the percentage inhibition at steady-state against the drug concentration. Data are expressed as means ± SEM (n = 5–7). (**B**) IC_{50} values for Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 and TTX-S Nav currents derived from the dose-response Hill curves shown in **A**. Note that amitriptyline shows a greater potency for nociceptor Nav channel isoforms (Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9) than for the TTX-S Nav channels (Nav1.1 and Nav1.6) present in non-nociceptive neurons.

local or systemic AEs. We also demonstrated that amitriptyline inhibited nocifensive behavior when applied to the skin and dampened nociceptive C and Aδ afferent signaling in a skin-nerve preparation from mice. Our findings indicate that topically applied amitriptyline acts through local peripheral inhibition of a variety of Nav channel subtypes, preferentially those expressed in nociceptors, and that amitriptyline induces calcium ion influx via TRPA1 channel activation.

Effectiveness of 10% Amitriptyline Hydrochloride Cream in Patients With CIPN

Our exploratory case series involving 25 patients with CIPN of the hands and/or feet suggested that topical 10% amitriptyline cream, administered twice daily for 1 month, could be effective at relieving the neuropathic pain induced by chemotherapy. This treatment allowed CIPN patients to continue their anticancer therapy without any adjustments to their chemotherapy dose or regimen. However, the major limitation of this case series was that it was carried out on 25 patients as part of their ongoing management, and thus this design did not allow for inclusion of a control arm. Further, larger scale and controlled studies are needed to confirm the effectiveness of the treatment.

CIPN is a common AE of cancer therapy and is characterized by spontaneous or evoked pain reported as electric shock-like sensations, burning, tingling, paresthesia, dysesthesia, allodynia, or hyperalgesia.[57] Symptoms persist or worsen with successive rounds of chemotherapy, and may continue for months or even years after chemotherapy. Indeed, among the patients in our case series, around 70% were referred for severe CIPN that persisted after completion of chemotherapy. Treatment options for relieving CIPN are very limited.[31] In the absence of an FDA-approved therapy, duloxetine, a serotonin, and norepinephrine dual reuptake inhibitor, is the only treatment option for CIPN recommended by the American Society of Clinical Oncology.[28] As onset of CIPN has a major impact on long-term quality of life and may lead to early dose reduction or early discontinuation of chemotherapy, there is an urgent need to develop new effective treatment strategies to improve outcomes for CIPN patients.[28]

A randomized controlled study evaluating the effectiveness of oral amitriptyline as a CIPN treatment found that amitriptyline had no significant effect on pain; however, the amitriptyline dose used in this study was kept low to limit the risk of AEs.[33] Similarly, randomized clinical trials evaluating the effectiveness of low-dose (<5%) topical amitriptyline in combination with 2% ketamine, or with 1.5% ketamine and .8% baclofen, revealed a trend toward the reduction of sensory symptoms and improvement of motor neuropathy, but no significant effect on pain.[7,23] The findings of our case series are in agreement with those reported by Rossignol et al (2019) showing that a 1-month treatment with high dose (10%) topical amitriptyline led to a significant reduction in pain scores.[46]

Skin irritation has been reported as a local AE of creams containing topical amitriptyline in some previous reports[54]; however, no local AEs were reported in our case series. In addition, some case reports have indicated that high-dose amitriptyline creams are associated with an increased risk of systemic absorption and AEs.[35,36] No systemic AEs were reported in our study or in the 44 CIPN patients treated with the 10% amitriptyline cream reported by Rossignol et al (2019).[46] In addition, preliminary analyses of blood samples from 12 patients in our study found no detectable levels (limit 40 ng/mL by immunoassay; Abbot laboratories) of amitriptyline, or its metabolite nortriptyline, in the serum. Although these analyses need to be conducted on a larger group of patients using a more sensitive detection method, these initial findings—taken together with the absence of systemic AEs in patients treated with the 10% amitriptyline cream—suggest that topical amitriptyline exerts an analgesic action by having a direct, local effect on the peripheral neuropathy.

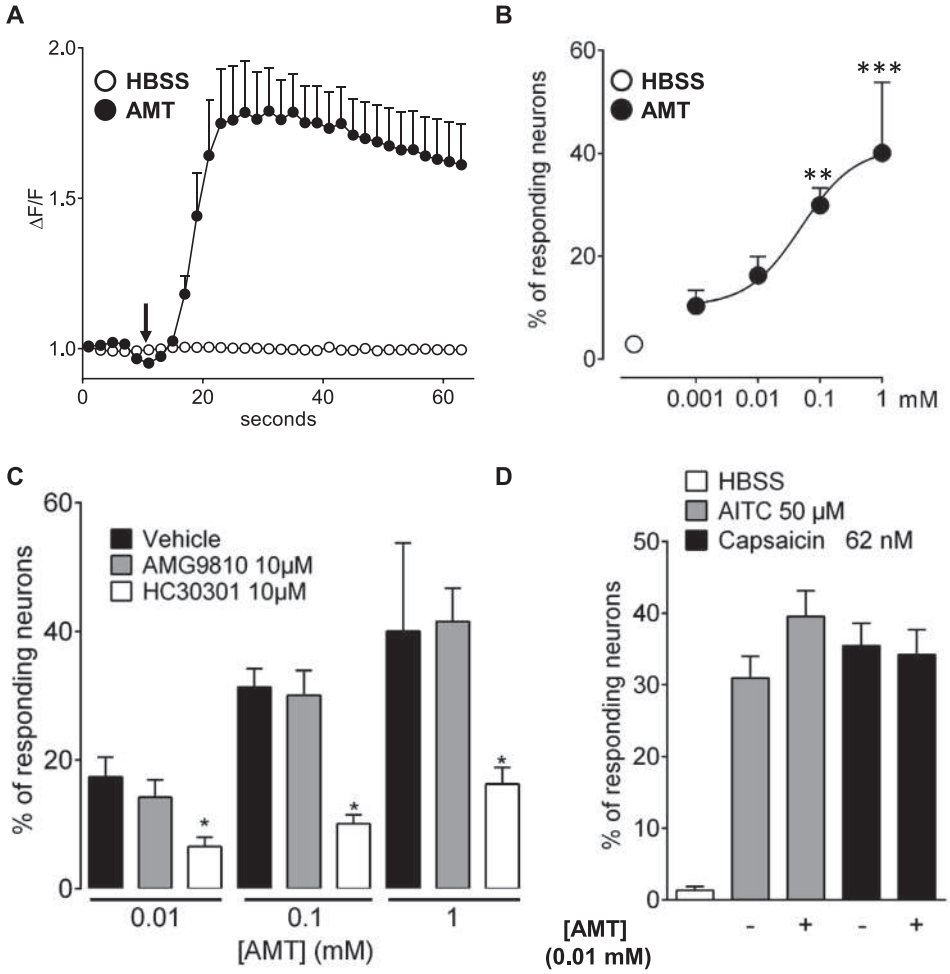


Figure 7. Amitriptyline induces an increase in intracellular [Ca^{2+}] in mouse sensory neurons through TRPA1. (**A**) Representative Ca^{2+} flux measurements in DRG neurons exposed to .1 mM amitriptyline (AMT). ΔF/F was calculated as maximal fluorescence/baseline fluorescence. The baseline fluorescence was measured over a 10-second period before the addition (indicated by the arrow) of either AMT (black circles) or the vehicle (HBSS; white circles). (**B**) Dose-response curve showing the percentage of DRG neurons displaying intracellular calcium mobilization in response to increasing amounts of amitriptyline (black circles). As a control, the response to exposure to HBSS alone is also shown (white circle). The percentage of responding neurons was calculated as the number of DRG neurons in which AMT induced calcium mobilization, relative to the total number of neurons identified by their ability to respond to 50 mM KCl. ***$P < .001$ and **$P < .01$, as compared to a control with the vehicle alone, according to the Kruskal-Wallis test and subsequent Dunn's multiple comparison tests. (**C**) Effects of a 5-minute incubation with 10 μM AMG9810 (TRPV1 antagonist) or HC30301 (TRPA1 antagonist) on amitriptyline-induced Ca^{2+} mobilization in mouse DRG neurons. Data are expressed as means ± SEM of 3 independent experiments with 2 wells per condition and 60 to 80 neurons per well. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test and subsequent Dunn's multiple comparison tests. *$P < .05$ for the difference between antagonist-treated cells compared with cells incubated with the vehicle alone. (**D**) Effects of a 5-minute incubation with .01 mM amitriptyline on Ca^{2+} mobilization induced by 62 nM capsaicin (TRPV1 agonist) or 50-μM allyl isothiocyanate (AITC; TRPA1 agonist) in mouse sensory neurons. Data are expressed as means ± SEM of 3 independent experiments with 2 wells per condition and 60 to 80 neurons per well. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test and subsequent Dunn's multiple comparison tests.

This preliminary study provided promising data that led us to investigate the mechanism of action of topical amitriptyline in detail in mice.

Antinociceptive Action of Amitriptyline Cream in Mice

Our in vivo experiments in mice demonstrated that amitriptyline cream could act on the peripheral nervous system, and was efficient at raising the nociceptive withdrawal threshold. These findings are in agreement with previous studies showing that amitriptyline applied to rodent paws can alleviate pain in animal models of neuropathic (nerve constriction injury) and inflammatory (formalin test) pain.[50]

Amitriptyline Inhibits Nociceptive Afferent Messages by Targeting Sodium Channels

Our experiments on sensory fibers in isolated mouse skin-saphenous nerve preparations indicate that amitriptyline, dose-dependently and reversibly, inhibited the evoked firing responses of the low-threshold Aβ-mechanosensory fibers and high-threshold C- and Aδ-sensory fibers that innervate the superficial layers of

the mouse skin. Thus, as expected from its wide-ranging action on sodium ion channels, amitriptyline suppressed the activities of sensory afferents regardless of their sensory modality. However, the degree of block appeared to be slightly greater in nociceptive fibers than in Aβ-mechanosensory fibers. Use-dependent block is classically associated with preferential binding of amitriptyline to inactivated and/or open-state Nav channels.[5] Use-dependent block is particularly advantageous for reducing ectopic discharge and pain transmission. At appropriate concentrations, these properties therefore predispose amitriptyline to preferentially target active nociceptive fibers over touch mechanoreceptors.

Patch–clamp-derived mechanistic analysis demonstrated that amitriptyline is a potent inhibitor of both TTX-sensitive and TTX-resistant Nav channels in DRG neurons, providing a potential mechanism of analgesia. Like many Nav inhibitors—including local anesthetics, anticonvulsants, antiarrhythmics, and analgesics—amitriptyline exerts most of its effects by stabilizing the channels in an inactivated conformation.[18,42] Through its inhibitory action on Nav channels, amitriptyline dampens the excitability of sensory neurons and abolishes the firing activity of cutaneous sensory nerve fibers. The inhibitory effects were more potent for Nav1.7, Nav1.8. and Nav1.9, distributed in DRG nociceptors, than for Nav1.1 and Nav1.6, which are primarily found in non-nociceptive sensory neurons.[47] The effect of amitriptyline was most potent on Nav1.7 and Nav1.8, with half-maximal inhibitory concentrations of 4.25 $\pm$ .4 and 6.97 $\pm$ .3 μM, respectively. Nav1.7 is an essential component of nociception and produces a rapidly activating and inactivating current involved in subthreshold depolarization and action potential generation. Gain-of-function mutations of the Nav1.7 gene, *SCN9A,* are associated with pain disorders such as inherited erythromelalgia and paroxysmal pain disorder[17,21]; whereas loss-of-function mutations are linked to the complete insensitivity to pain that may be accompanied by anosmia.[13,24] In addition, increased Nav1.7 expression has been implicated in paclitaxel- and oxaliplatin-induced CIPN.[58] The Nav1.8 channel is also associated with clear pain phenotypes in humans, with gain-of-function mutations causing painful peripheral neuropathy[20] and gene polymorphisms appearing to be associated with an increased incidence of oxaliplatin-induced CIPN.[4] Amitriptyline was also a very potent inhibitor of Nav1.9, which is strongly expressed in nociceptors and which contributes to the generation of a persistent inward current at subthreshold voltages.[16] Nav1.9 is associated with diverse clinical disorders including familial episodic limb pain,[59] congenital insensitivity to pain,[40] and small fiber neuropathy.[34] Thus, the broad potency of amitriptyline toward the nociceptor channels Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9 may prove to be a valuable characteristic, allowing topical amitriptyline to be an effective analgesic for a range of conditions. However, it should be noted that these studies were carried out using wild-type mice measuring evoked pain, and it may be of interest to perform further studies, if technically feasible, to investigate the efficacy of topical amitriptyline in an animal model of CIPN.

Amitriptyline Induces Calcium Ion Influx by Activation of TRPA1

Our study of the effect of amitriptyline on calcium ion mobilization revealed that amitriptyline increases the intracellular calcium concentration in sensory neurons via TRPA1 channel activation. TRPA1 is predominantly expressed in nociceptive C- and Aδ-type sensory neurons in DRGs and the trigeminal ganglia.[53] It plays a key role in chemonociception and is activated in response to a broad range of exogenous stimuli found in many plants, food, cosmetics, and pollutants, and by endogenous stimuli such as bradykinin, prostaglandins and hydrogen peroxide.[55] In addition, TPRA1 activation plays a role in diabetic neuropathy and CIPN induced by oxaliplatin, vincristine and paclitaxel.[8]

The precise role played by amitriptyline-induced TRPA1 activation in the action of amitriptyline remains to be determined. On the one hand, pungent natural compounds (mustard, clove, cinnamon, ginger etc.) that induce burning sensations are known to activate TRPA1,[6] and burning skin irritation has been reported in a few studies as a local side effect of amitriptyline cream use.[54] Sensitization of sensory neurons via activation of TRPA1 has also already been implicated in injection site and postoperative inflammation and pain after use of local anesthetics.[38,39] However, no local AEs were reported by the 25 patients in our case series or by the 44 CIPN patients treated with the 10% amitriptyline cream in the study by Rossignol et al (2019).[46] On the other hand, the TRPA1 activation could also be involved in the analgesic action of amitriptyline. Agonist-induced intracellular accumulation of calcium has already been shown to lead to TRPA1 desensitization in sensory neurons[2] and a mechanism involving initial activation of TRPA1, followed by desensitization and sustained inhibition, has already been implicated in the antinociceptive action of acetaminophen.[3] Thus, amitriptyline-induced activation of the TRPA1 channel may be implicated in the onset of local AEs, such as the burning sensations and skin irritation at cream application sites reported previously in a few cases, whereas its subsequent desensitization may contribute to the analgesic activity of topical amitriptyline.

Conclusions

The results of our case series provided an indication that 10% topical amitriptyline had an analgesic action that was mediated by local, rather than systemic, effects on neuropathic pain in patients with severe CIPN. Thus, topical amitriptyline will be expected to have a much better safety profile compared to oral and parenteral routes. The results of our studies in mice, and on sensory small fibers from the peripheral nervous system, provided insight into the mechanisms underlying the potential pain-relieving effects of 10% amitriptyline

cream in the patients with CIPN. Taken together these findings suggested that the high-dose topically administered amitriptyline displayed antinociceptive action in the peripheral nervous system through potent inhibition of nociceptor Nav channels and nociceptive fiber firing.

Acknowledgments

The authors would like to thank Drs Emma Pilling and Marielle Romet (Santé Active Edition) for language editing and writing assistance and Pharmacie Delpech (Paris) for preparation of the amitriptyline hydrochloride cream used in this study. Céline Greco would also like to thank the Ecole de l'Inserm Liliane-Bettencourt and Fondation Bettencourt-Schueller for their support.

References

1. Abdelhamid RE, Kovacs KJ, Nunez MG, Larson AA: Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. Pharmacol Res 79:21-27, 2014

2. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM: Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. J Physiol 583:175-193, 2007

3. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, Bucher B, Galzi JL, Sterner O, Bevan S, Hogestatt ED, Zygmunt PM: TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabiorcol. Nat Commun 2:551, 2011

4. Argyriou AA, Cavaletti G, Antonacopoulou A, Genazzani AA, Briani C, Bruna J, Terrazzino S, Velasco R, Alberti P, Campagnolo M, Lonardi S, Cortinovis D, Cazzaniga M, Santos C, Psaromyalou A, Angelopoulou A, Kalofonos HP: Voltage-gated sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: Results from a prospective multicenter study. Cancer 119:3570-3577, 2013

5. Bagal SK, Marron BE, Owen RM, Storer RI, Swain NA: Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. Channels (Austin) 9:360-366, 2015

6. 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

7. Barton DL, Wos EJ, Qin R, Mattar BI, Green NB, Lanier KS, Bearden JD 3rd, Kugler JW, Hoff KL, Reddy PS, Rowland KM Jr., Riepl M, Christensen B, Loprinzi CL: A double-blind, placebo-controlled trial of a topical treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: NCCTG trial N06CA. Support Care Cancer 19:833-841, 2011

8. Basso L, Altier C: Transient receptor potential channels in neuropathic pain. Curr Opin Pharmacol 32:9-15, 2017

9. Bonnet C, Hao J, Osorio N, Donnet A, Penalba V, Ruel J, Delmas P: Maladaptive activation of Nav1.9 channels by nitric oxide causes triptan-induced medication overuse headache. Nat Commun 10:4253, 2019

10. Brooks KG, Kessler TL: Treatments for neuropathic pain. Pharm J 9:1-12, 2017

11. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN: Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers 3:1-19, 2017

12. Coste B, Crest M, Delmas P: Pharmacological dissection and distribution of NaN/Nav1.9, T-type Ca2+ currents, and mechanically activated cation currents in different populations of DRG neurons. J Gen Physiol 129:57-77, 2007

13. Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG: An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. Nature 444:894-898, 2006

14. Devor M: Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. J Pain 7:S3-S12, 2006

15. Dharmshaktu P, Tayal V, Kalra BS: Efficacy of antidepressants as analgesics: A review. J Clin Pharmacol 52:6-17, 2012

16. Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG: NaV1.9: A sodium channel linked to human pain. Nat Rev Neurosci 16:511-519, 2015

17. Dib-Hajj SD, Rush AM, Cummins TR, Hisama FM, Novella S, Tyrrell L, Marshall L, Waxman SG: Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons. Brain 128:1847-1854, 2005

18. Dick IE, Brochu RM, Purohit Y, Kaczorowski GJ, Martin WJ, Priest BT: Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. J Pain 8:315-324, 2007

19. Edelsberg JS, Lord C, Oster G: Systematic review and meta-analysis of efficacy, safety, and tolerability data from randomized controlled trials of drugs used to treat postherpetic neuralgia. Ann Pharmacother 45:1483-1490, 2011

20. Faber CG, Lauria G, Merkies IS, Cheng X, Han C, Ahn HS, Persson AK, Hoeijmakers JG, Gerrits MM, Pierro T, Lombardi R, Kapetis D, Dib-Hajj SD, Waxman SG: Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. Proc Natl Acad Sci U S A 109:19444-19449, 2012

21. Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamsen B, Ostman J, Klugbauer N, Wood JN, Gardiner RM, Rees M: SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: Allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. Neuron 52:767-774, 2006

22. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice ASC, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M: Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. Lancet Neurol 14:162-173, 2015

23. Gewandter JS, Mohile SG, Heckler CE, Ryan JL, Kirshner JJ, Flynn PJ, Hopkins JO, Morrow GR: A phase III randomized, placebo-controlled study of topical amitriptyline and ketamine for chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): A University of Rochester CCOP study of 462 cancer survivors. Support Care Cancer 22:1807-1814, 2014

24. Goldberg YP, MacFarlane J, MacDonald ML, Thompson J, Dube MP, Mattice M, Fraser R, Young C, Hossain S, Pape T, Payne B, Radomski C, Donaldson G, Ives E, Cox J, Younghusband HB, Green R, Duff A, Boltshauser E, Grinspan GA, Dimon JH, Sibley BG, Andria G, Toscano E, Kerdraon J, Bowsher D, Pimstone SN, Samuels ME, Sherrington R, Hayden MR: Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. Clin Genet 71:311-319, 2007

25. Griebeler ML, Morey-Vargas OL, Brito JP, Tsapas A, Wang Z, Carranza Leon BG, Phung OJ, Montori VM, Murad MH: Pharmacologic interventions for painful diabetic neuropathy: An umbrella systematic review and comparative effectiveness network meta-analysis. Ann Intern Med 161:639-649, 2014

26. Hao J, Padilla F, Dandonneau M, Lavebratt C, Lesage F, Noel J, Delmas P: Kv1.1 channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. Neuron 77:899-914, 2013

27. Häuser W, Bernardy K, Üçeyler N, Sommer C: Treatment of fibromyalgia syndrome with antidepressants: A meta-analysis. JAMA 301:198-209, 2009

28. Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, Chauhan C, Gavin P, Lavino A, Lustberg MB, Paice J, Schneider B, Smith ML, Smith T, Terstriep S, Wagner-Johnston N, Bak K, Loprinzi CL: 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, 2014

29. Ho C, O'Leary ME: Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. Mol Cell Neurosci 46:159-166, 2011

30. Horishita T, Yanagihara N, Ueno S, Okura D, Horishita R, Minami T, Ogata Y, Sudo Y, Uezono Y, Sata T, Kawasaki T: Antidepressants inhibit Nav1.3, Nav1.7, and Nav1.8 neuronal voltage-gated sodium channels more potently than Nav1.2 and Nav1.6 channels expressed in Xenopus oocytes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 390:1255-1270, 2017

31. Hou S, Huh B, Kim HK, Kim KH, Abdi S: Treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Systematic review and recommendations. Pain Physician 21:571-592, 2018

32. Jensen MP, McFarland CA: Increasing the reliability and validity of pain intensity measurement in chronic pain patients. Pain 55:195-203, 1993

33. Kautio AL, Haanpaa M, Saarto T, Kalso E: Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. J Pain Symptom Manage 35:31-39, 2008

34. Kleggetveit IP, Schmidt R, Namer B, Salter H, Helas T, Schmelz M, Jorum E: Pathological nociceptors in two patients with erythromelalgia-like symptoms and rare genetic Nav 1.9 variants. Brain Behav 6:e00528, 2016

35. Kopsky DJ, Hesselink JM: High doses of topical amitriptyline in neuropathic pain: Two cases and literature review. Pain Pract 12:148-153, 2012

36. Kopsky DJ, Liebregts R, Keppel Hesselink JM: Central neuropathic pain in a patient with multiple sclerosis treated successfully with topical amitriptyline. Case Rep Med 2012:471835, 2012

37. Lawson K: A brief review of the pharmacology of amitriptyline and clinical outcomes in treating fibromyalgia. Biomedicines 5, 2017

38. Leffler A, Fischer MJ, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Sauer SK, Gavva NR, Reeh PW, Nau C: The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. J Clin Invest 118:763-776, 2008

39. Leffler A, Lattrell A, Kronewald S, Niedermirtl F, Nau C: Activation of TRPA1 by membrane permeable local anesthetics. Mol Pain 7:62, 2011

40. Leipold E, Liebmann L, Korenke GC, Heinrich T, Giesselmann S, Baets J, Ebbinghaus M, Goral RO, Stodberg T, Hennings JC, Bergmann M, Altmuller J, Thiele H, Wetzel A, Nurnberg P, Timmerman V, De Jonghe P, Blum R, Schaible HG, Weis J, Heinemann SH, Hubner CA, Kurth I: A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. Nat Genet 45:1399-1404, 2013

41. Liang J, Liu X, Zheng J, Yu S: Effect of amitriptyline on tetrodotoxin-resistant Nav1.9 currents in nociceptive trigeminal neurons. Mol Pain 9:31, 2013

42. Nau C, Seaver M, Wang SY, Wang GK: Block of human heart hH1 sodium channels by amitriptyline. J Pharmacol Exp Ther 292:1015-1023, 2000

43. Obata H: Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain. Int J Mol Sci 18, 2017, 2483

44. Olah Z, Josvay K, Pecze L, Letoha T, Babai N, Budai D, Otvos F, Szalma S, Vizler C: Anti-calmodulins and tricyclic adjuvants in pain therapy block the TRPV1 channel. PLoS One 2:e545, 2007

45. Reyes-Mendez ME, Castro-Sánchez LA, Dagnino-Acosta A, Aguilar-Martínez I, Pérez-Burgos A, Vázquez-Jiménez C, Moreno-Galindo EG, Álvarez-Cervera FJ, Góngora-Alfaro JL, Navarro-Polanco RA, Alamilla J: Capsaicin produces antidepressant-like effects in the forced swimming test and enhances the response of a sub-effective dose of amitriptyline in rats. Physiol Behav 195:158-166, 2018

46. Rossignol J, Cozzi B, Liebaert F, Hatton S, Viallard ML, Hermine O, Greco C: High concentration of topical amitriptyline for treating chemotherapy-induced neuropathies. Support Care Cancer 27:3053-3059, 2019

47. Rush AM, Cummins TR, Waxman SG: Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. J Physiol 579:1-14, 2007

48. Santos-Nogueira E, Redondo Castro E, Mancuso R, Navarro X: Randall-Selitto test: A new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. J Neurotrauma 29:898-904, 2012

49. Sawynok J: Antidepressants as analgesics: An introduction. J Psychiatry Neurosci 26:20, 2001

50. Smith H: Topical analgesic agents. Current Therapy in Pain. Philadelphia, PA, Saunders Elsevier, 2009, pp 501-507

51. Spallone V, Morganti R, D'Amato C, Greco C, Cacciotti L, Marfia GA: Validation of DN4 as a screening tool for neuropathic pain in painful diabetic polyneuropathy. Diabet Med 29:578-585, 2012

52. Stevens EB, Stephens GJ: Recent advances in targeting ion channels to treat chronic pain. Br J Pharmacol 175:2133-2137, 2018

53. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell 112:819-829, 2003

54. Thompson DF, Brooks KG: Systematic review of topical amitriptyline for the treatment of neuropathic pain. J Clin Pharm Ther 40:496-503, 2015

55. Viana F: TRPA1 channels: Molecular sentinels of cellular stress and tissue damage. J Physiol 594:4151-4169, 2016

56. Waxman SG, Zamponi GW: Regulating excitability of peripheral afferents: Emerging ion channel targets. Nat Neurosci 17:153-163, 2014

57. Yoon SY, Oh J: Neuropathic cancer pain: Prevalence, pathophysiology, and management. Korean J Intern Med 33:1058-1069, 2018

58. Zajaczkowska R, Kocot-Kepska M, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J: Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Int J Mol Sci 20, 2019, 1451

59. Zhang XY, Wen J, Yang W, Wang C, Gao L, Zheng LH, Wang T, Ran K, Li Y, Li X, Xu M, Luo J, Feng S, Ma X, Ma H, Chai Z, Zhou Z, Yao J, Zhang X, Liu JY: Gain-of-function mutations in SCN11A cause familial episodic pain. Am J Hum Genet 93:957-966, 2013

60. Zimmerman A, Bai L, Ginty DD: The gentle touch receptors of mammalian skin. Science 346:950-954, 2014

61. Zimmermann K, Hein A, Hager U, Kaczmarek JS, Turnquist BP, Clapham DE, Reeh PW: Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. Nat Protoc 4:174-196, 2009

62. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16:109-110, 1983

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Peripheral Opioid Receptor Blockade Enhances Epithelial Damage in Piroxicam-Accelerated Colitis in IL-10-Deficient Mice

Xavier Mas-Orea [1], Morgane Sebert [1], Mehdi Benamar [2], Camille Petitfils [1], Catherine Blanpied [1], Abdelhadi Saoudi [2], Céline Deraison [1], Frederick Barreau [1], Nicolas Cenac [1] and Gilles Dietrich [1,*]

1 IRSD, Université de Toulouse—Paul Sabatier, INSERM, INRAe, ENVT, UPS, 31000 Toulouse, France; xavier.mas-orea@inserm.fr (X.M.-O.); morgane.sebert@hotmail.com (M.S.); camille.petitfils@inserm.fr (C.P.); catherine.blanpied@inserm.fr (C.B.); celine.deraison@inserm.fr (C.D.); frederick.barreau@inserm.fr (F.B.); nicolas.cenac@inserm.fr (N.C.)

2 INFINITY, Université de Toulouse—Paul Sabatier, INSERM, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France; Mehdi.Benamar@childrens.harvard.edu (M.B.); abdelhadi.saoudi@inserm.fr (A.S.)

* Correspondence: gilles.dietrich@inserm.fr

Abstract: Mucosal CD4$^+$ T lymphocytes display a potent opioid-mediated analgesic activity in interleukin (IL)-10 knockout mouse model of inflammatory bowel diseases (IBD). Considering that endogenous opioids may also exhibit anti-inflammatory activities in the periphery, we examined the consequences of a peripheral opioid receptor blockade by naloxone-methiodide, a general opioid receptor antagonist unable to cross the blood–brain barrier, on the development of piroxicam-accelerated colitis in IL-10-deficient (IL-10$^{-/-}$) mice. Here, we show that IL-10-deficient mice treated with piroxicam exhibited significant alterations of the intestinal barrier function, including permeability, inflammation-related bioactive lipid mediators, and mucosal CD4$^+$ T lymphocyte subsets. Opioid receptor antagonization in the periphery had virtually no effect on colitis severity but significantly worsened epithelial cell apoptosis and intestinal permeability. Thus, although the endogenous opioid tone is not sufficient to reduce the severity of colitis significantly, it substantially contributes to the protection of the physical integrity of the epithelial barrier.

Keywords: opioids; colitis; intestinal permeability; apoptosis; piroxicam; IL-10-deficient mice

check for updates

Citation: Mas-Orea, X.; Sebert, M.; Benamar, M.; Petitfils, C.; Blanpied, C.; Saoudi, A.; Deraison, C.; Barreau, F.; Cenac, N.; Dietrich, G. Peripheral Opioid Receptor Blockade Enhances Epithelial Damage in Piroxicam-Accelerated Colitis in IL-10-Deficient Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7387. https://doi.org/10.3390/ijms22147387

Academic Editors: Véronique Carrière and Sophie Thenet

Received: 26 May 2021
Accepted: 7 July 2021
Published: 9 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Mucosal T lymphocytes play a key role in the endogenous regulation of visceral sensitivity in physiological as well as in pathological situations [1–6]. The analgesic effect of T lymphocytes is dependent on their ability to synthesize opioids upon antigen-priming and to release their opioid content at the vicinity of opioid receptors-expressing nociceptors [3,7–12]. Of note, even in the IL-10-deficient mouse model mimicking severe infantile Crohn's disease associated with IL-10 loss of function, colitogenic CD4$^+$ T lymphocytes conserve their analgesic activity [13]. Altogether these observations strengthen the rationale of a number of potential therapeutic strategies which propose to enhance or mimic immune-mediated endogenous opioid activity in chronic intestinal inflammatory diseases [14–16]. These therapeutic approaches aim at targeting opioid receptors in the periphery [17–19] and, for some of them, opioid receptors specifically located within the inflamed tissue [1,20–24] or at reinforcing endogenous immune-derived opioid tone [25,26]. Considering that opioid drugs also display anti-inflammatory effects [27–30], it may be expected that the alternative therapeutic strategies promoting mucosal endogenous opioid tone may also improve clinical outcomes in inflammatory bowel diseases (IBD).

Here, we examined the impact of opioids locally produced within the gut on the development of colitis in IL-10-deficient (IL-10$^{-/-}$) mice. We used piroxicam, which has no effect on wild-type mice, to accelerate/synchronize the development of colitis in

IL-10$^{-/-}$ mice [31–33] and naloxone-methiodide, a general opioid receptor antagonist that does not cross the blood-brain barrier to neutralize opioid receptors in the periphery.

2. Results

2.1. Il-10$^{-/-}$ Mice Treated with Piroxicam Develop Colitis

IL-10$^{-/-}$ mice fed with standard chow diet containing piroxicam for 10 days developed colitis characterized by a significant body weight loss (Figure 1a) and severe macroscopic (Figure 1b–d) and microscopic (Figure 1e,f) colonic lesions as compared to age-matched IL-10$^{-/-}$ mice fed with standard chow diet free of piroxicam. Treatment with piroxicam induced the apoptosis of intestinal epithelial cells (virtually absent in untreated mice) as assessed by anti-active caspase 3 staining (Figure 1g), which, in turn, resulted in an increase in intestinal paracellular permeability as assessed by quantifying fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran in blood four hours after administering it by gavage (Figure 1h).

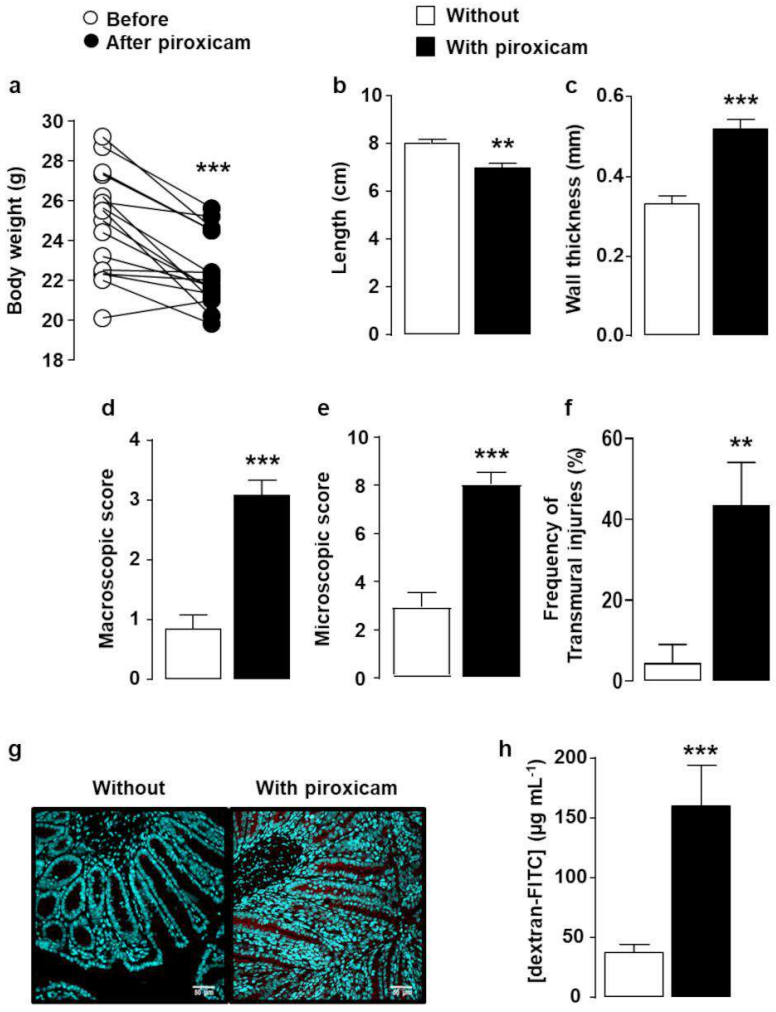


Figure 1. Colitis severity in IL-10$^{-/-}$ mice fed with piroxicam. IL-10$^{-/-}$ mice were fed with standard chow diet without (white) or with piroxicam (black) for 10 days (n = 14–18/group). Colitis parameters included body weight loss ((**a**), bodyweight before (white circle) and after piroxicam treatment (black circle), each symbol represents 1 mouse), colonic length (**b**), wall thickness (**c**), both macroscopic (**d**), and microscopic (**e**) colonic tissue damage including the percentage of transmural colon injuries (**f**). A representative immunohistological staining of apoptotic epithelial cells using anti-activated caspase 3 antibodies is shown in (**g**). Paracellular permeability expressed as the mean of FITC-dextran concentration in serum (µg mL^{-1}) 4 h after gavage with dextran is depicted in (**h**). Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney U test except for panel A where statistical analysis was performed using the Wilcoxon matched pairs test, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The piroxicam-induced alteration of the epithelium integrity sufficient to favor bacterial translocation, elicits an immune response that, in the absence of the immunoregulatory activity of IL-10, leads to colitis [32]. Development of colitis was associated with a 3- to 60-fold increase in mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines including IL-1β, tumor necrosis factor (TNF)-α, interferon (IFN)-γ, IL-17, and IL-22 (Figure 2a). The tissue production of 5-lipoxygenase-derived pro-inflammatory lipids such as 5-oxoeicosatetraenoic acid (5-oxoETE) and leukotriene B4 (LtB_4) remained unchanged while that of cyclooxygenase-derived lipids including 6-keto-prostaglandin F1 alpha ($6\text{-kPGF}_{1\alpha}$), PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$, was reduced (Figure 2b) in agreement with the inhibitory effect of piroxicam on the cyclooxygenase activity [31]. By contrast, two out of four docosahexaenoic acid (DHA)-derived pro-resolving lipids, including resolvin D5 (RvD5) and protectin Dx (PDx) were increased (Figure 2c).

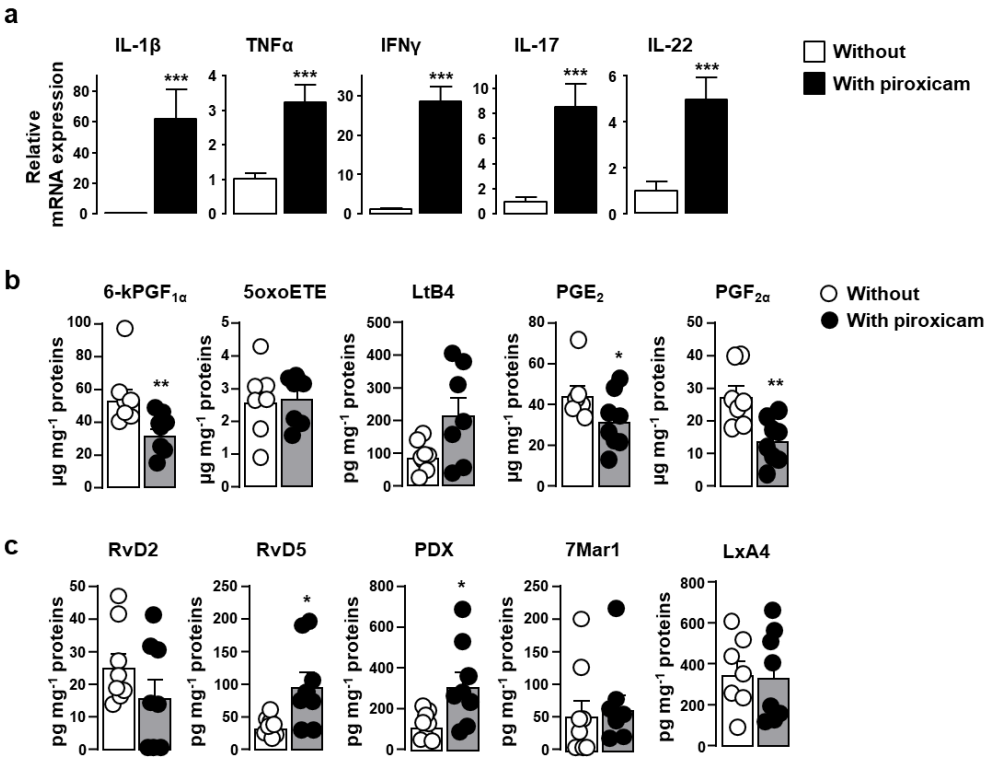


Figure 2. Inflammation-related parameters in IL-$10^{-/-}$ mice fed with piroxicam. IL-$10^{-/-}$ mice were fed with standard chow diet without (white symbols) or with piroxicam (black symbols) for 10 days. mRNA encoding for pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNFα, IFNγ, IL-17, IL-22 was quantified by real-time PCR in colonic biopsies (**a**) (n = 14–18/group). mRNA content was normalized to the *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (*HPRT*) mRNA and quantified relative to standard cDNA prepared from referential mouse inflamed colonic tissue (calibrator samples). For each sample, mRNA level was expressed relative to the average of mRNA levels in untreated IL$10^{-/-}$ mice. Data are expressed as mean ± SEM. Pro-inflammatory (**b**) and pro-resolving (**c**) bioactive lipids were quantified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as expressed in pg or µg per milligrams of colonic tissue proteins (n = 8/group). Each symbol represents 1 mouse. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Colitis in piroxicam-treated IL-$10^{-/-}$ mice was associated, within the *lamina propria*, with an increase in the frequencies of $CD4^+$ T lymphocytes producing either IFNγ (Th1), both IFNγ and IL-17 (a feature of colitis-associated Th17) or IL-4 (Th2) as well as FoxP3-expressing regulatory T lymphocytes as compared to untreated IL-$10^{-/-}$ mice (Figure 3a). Although the frequency of single IL-17 producers was unchanged, the increase in the other $CD4^+$ T lymphocyte subsets correlated with increased production of the relevant cytokines

IFNγ (Th1), IL-17 (Th17) and IL-4 (Th2) as assessed by geometric mean of fluorescence intensity (gMFI) (Figure 3b). The number of $CD4^+$ T lymphocytes within the *lamina propria* was similar (data not shown).

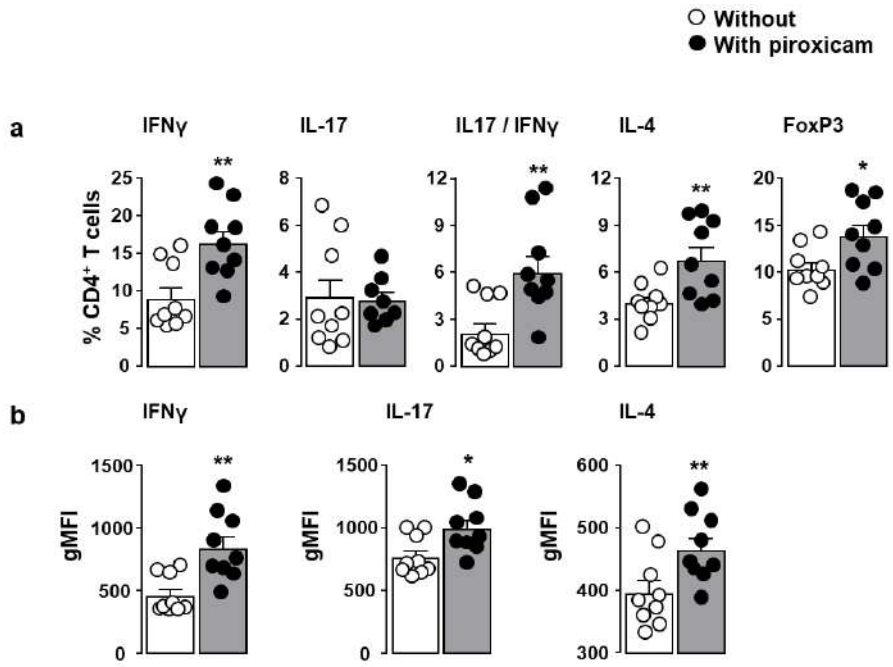


Figure 3. Frequency of $CD4^+$ T lymphocytes with Th1, Th17, Th2, and Treg (regulatory T cells) phenotypes in IL-$10^{-/-}$ mice fed with piroxicam. IL-$10^{-/-}$ mice were fed with standard chow diet without (white circles) or with piroxicam (black circles) for 10 days. The frequencies of $CD4^+$ T lymphocytes producing IFNγ (Th1), IL-17 (Th17), both IFNγ and IL-17 (Th17), or IL-4 (Th2), as well as $CD4^+$ T lymphocytes expressing the lineage specification transcriptional factor Foxp3 (Treg) within *lamina propria*, were analyzed by cytofluorometry (**a**). The corresponding cytokine expression levels expressed as geometric mean of fluorescence intensity (gMFI) are depicted in panel (**b**). Each symbol represents 1 mouse ($n = 9$/group). Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2.2. Peripheral Opioid Receptor Blockade by Naloxone-Methiodide Increases Intestinal Epithelial Cell Apoptosis in Il-$10^{-/-}$ Mice with Colitis

In order to examine the impact of the mucosal opioid tone on the development of colitis, IL-$10^{-/-}$ mice fed with standard chow diet containing piroxicam were intraperitoneally injected over the 10 days of treatment with either PBS or naloxone-methiodide (NLX-methiodide), a general antagonist of opioid receptors unable to cross the blood-brain barrier, that has no pro-inflammatory effect *per se* in normal mice (Supplementary Figure S1). As shown in Figure 4, although the frequency of transmural colonic damage was increased (Figure 4f), NLX-methiodide treatment did not worsen the colitis as assessed by body weight loss (Figure 4a), colonic length (Figure 4b), colonic wall thickening (Figure 4c), macroscopic and microscopic colonic lesions (Figure 4d,e). However, even if the severity of colitis remained virtually unchanged, peripheral opioid receptor neutralization resulted in an increase in both epithelial cell apoptosis (Figure 4g) and intestinal permeability (Figure 4h).

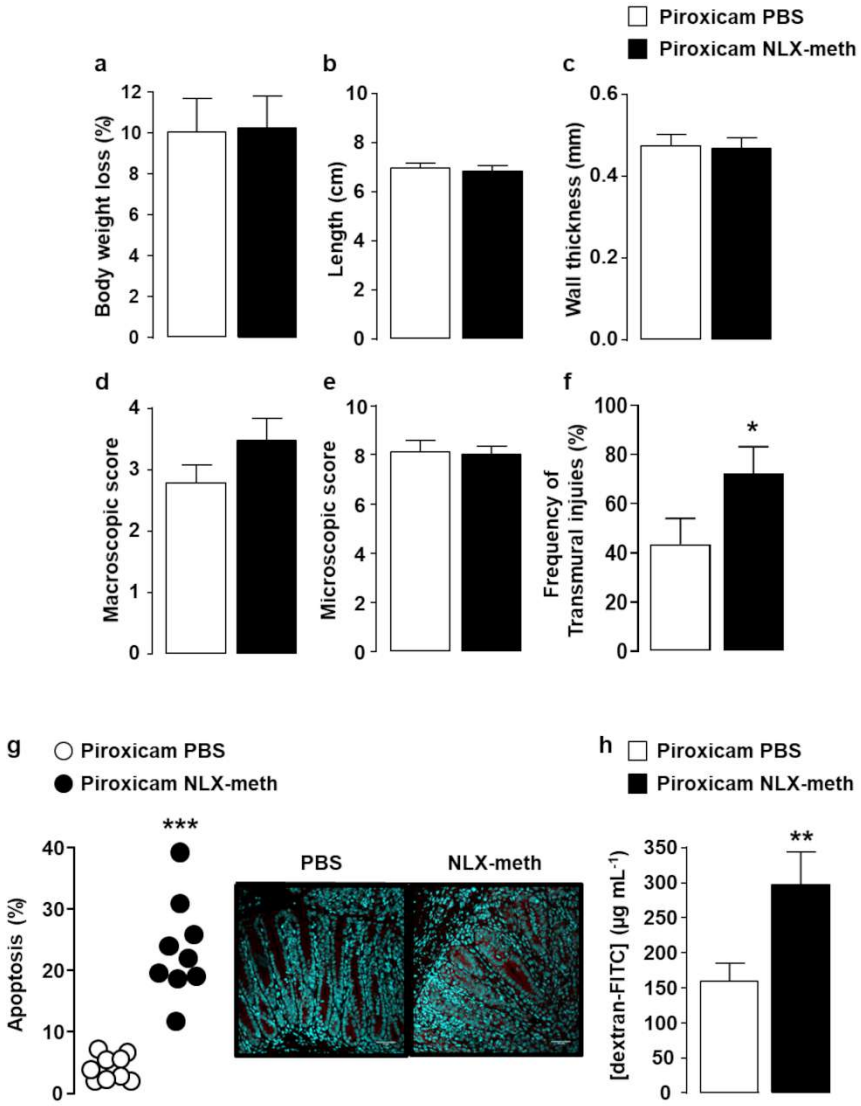


Figure 4. Effects of peripheral opioid receptor blockade on colitis severity in piroxicam-treated IL-$10^{-/-}$ mice. $IL10^{-/-}$ mice were injected with PBS (white symbols) or naloxone-methiodide (NLX-meth, 2 mg) (black symbols) two days apart for the ten days of piroxicam treatment (n = 17–20/group). Colitis parameters included percent of body weight loss (**a**), colonic length (**b**), wall thickness (**c**), both macroscopic (**d**) and microscopic (**e**) colonic tissue damage including the percentage of transmural colon injuries (**f**). Epithelial apoptosis identified with anti-activated caspase 3 antibodies was quantified relative to epithelium surface ((**g**) left panel, each symbol represents 1 mouse). A representative immunohistological staining of apoptotic epithelial cells is shown in the right panel. Paracellular permeability expressed as the mean of FITC-dextran concentration in serum (µg mL^{-1}) 4 h after gavage with dextran (n = 10–13/group) is depicted in (**h**). Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

mRNA expression levels of all the pro-inflammatory cytokines were unchanged following peripheral opioid receptor antagonization by naloxone-methiodide (Figure 5a). Similarly, no effect was observed on tissue production of all the polyunsaturated fatty acids with pro-inflammatory (Figure 5b) or pro-resolving (Figure 5c) activities that we examined.

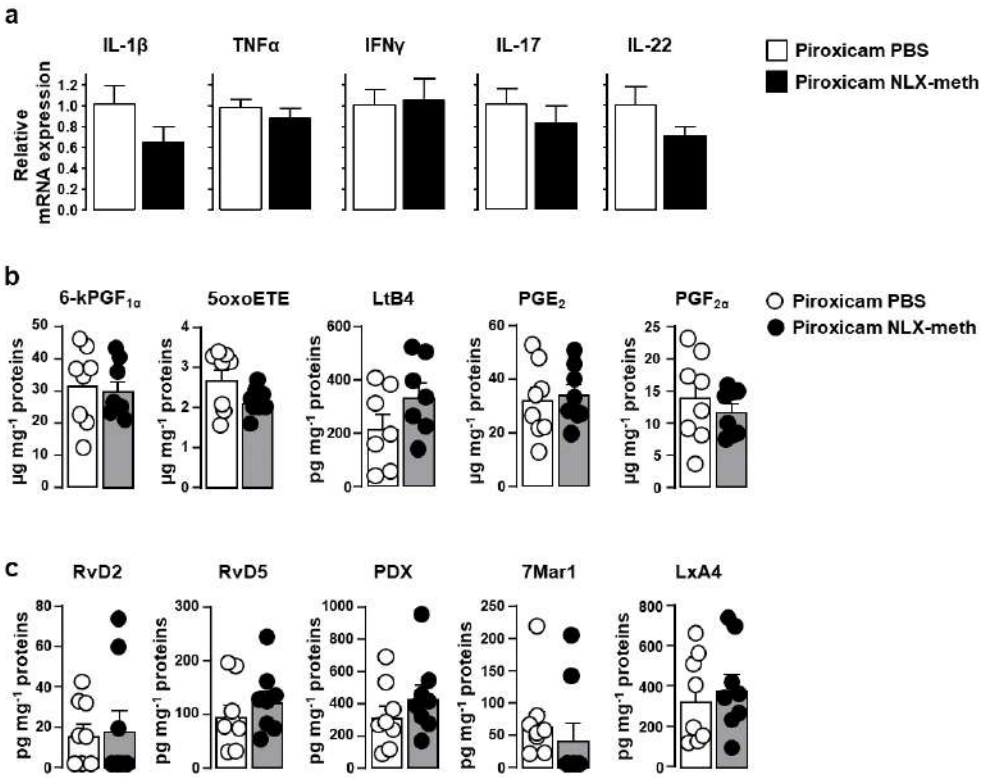


Figure 5. Effects of peripheral opioid receptor blockade on inflammation-related parameters in piroxicam-treated IL-10$^{-/-}$. IL10$^{-/-}$ mice were injected with PBS (white symbols) or naloxone-methiodide (NLX-meth) (black symbols) two days apart for the ten days of piroxicam treatment. mRNA encoding for pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNFα, IFNγ, IL-17, IL-22 was quantified by real-time PCR in colonic biopsies (**a**) (n = 13–17/group) as described above. Data are expressed as mean ± SEM. Pro-inflammatory (**b**) and pro-resolving (**c**) bioactive lipids were quantified by LC-MS/MS as expressed in pg or µg per milligrams of colonic tissue proteins (n = 8/group). Each symbol represents 1 mouse. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test.

The frequency of Th1, Th17, and FoxP3^{+} Treg subsets of mucosal CD4^{+} T lymphocytes as well as their respective ability to produce the prototypical cytokines IFNγ and/or IL-17 was not affected by the neutralization of opioid receptors in the periphery. Contrasting with the Th1 and Th17 subsets, the frequency of Th2 lymphocytes as well as the expression level of IL-4 was significantly reduced by naloxone-methiodide treatment (Figure 6a,b). The number of CD4^{+} T lymphocytes within the *lamina propria* was unchanged (data not shown).

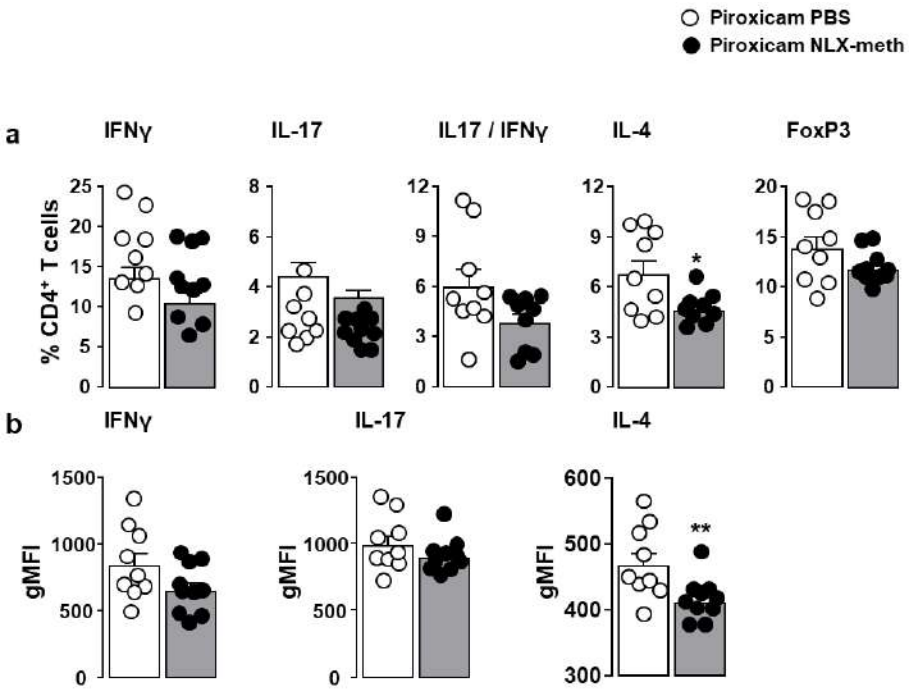


Figure 6. Effects of peripheral opioid receptor blockade on the frequency of Th1, Th17, Th2, and Treg in piroxicam-treated IL-10$^{-/-}$. IL10$^{-/-}$ mice were injected with PBS (white circles) or naloxone-methiodide (NLX-meth) (black circles) two days apart for the ten days of piroxicam treatment. The frequencies of CD4^{+} T lymphocytes producing IFNγ (Th1), IL-17 (Th17), both IFNγ and IL-17 (Th17), or IL-4 (Th2) as well as CD4^{+} T lymphocytes expressing the lineage specification transcriptional factor Foxp3 (Treg) within *lamina propria* were analyzed by cytofluorometry (**a**). The corresponding cytokine expression levels expressed as the geometric mean of fluorescence intensity (gMFI) are depicted in panel (**b**). Each symbol represents 1 mouse (n = 9–10/group). Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. Discussion

Anomalies in genes related to the immune response and/or the physical intestinal barrier are predisposing to intestinal bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease [34]. Among immune-related genes associated with Crohn's disease, those involving the IL-10 regulatory pathway are associated with severe forms of the disease [35–37]. In IL-10$^{-/-}$ mice, the spontaneous onset of the colitis has been associated with an increased intestinal permeability [38], a primary event mimicked by the exposure to piroxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug inducing epithelial cell apoptosis [32]. The increase in intestinal permeability favors the passage of bacteria from the lumen towards the *lamina propria*, thereby inducing an immune response that, in the absence of efficient regulation, results in chronic inflammation [32,33,39]. As expected, piroxicam-induced colitis in IL-10$^{-/-}$ mice was associated with a huge increase in inflammatory cytokines within the inflamed colonic tissue. Th1, Th17, and Th2 subsets of mucosal CD4^{+} T lymphocytes were increased, but the frequency of Th1 and Th17 colitogenic T cells were nearly 4-fold-higher than that of Th2. As reported in IBD patients, the frequency of FoxP3^{+} Treg was increased, but genetic deletion of IL-10 makes them not efficient enough [40–44]. In IL-10$^{-/-}$ mice, as for a number of other models including Th1/Th17- or Th2-driven colitis, colitogenic T lymphocytes maintain their ability to produce enkephalins [2,4,13,45].

Immune-derived opioids exhibit anti-inflammatory activities in Th1/Th17-driven colitis because of their propensity to favor the commitment of lymphocytes towards a Th2 phenotype [45–49]. However, the anti-inflammatory effects of endogenous opioids have been shown in colitis models mimicking an excessive immune response in which innate and adaptive immune cells display unaltered functional properties [1,2,27,28,45].

Moreover, although the reduction of the inflammatory cell activity is primordial, the restoration of the epithelial barrier integrity is necessary to minimize bacterial-induced inflammatory response [50–52]. Accordingly, we investigated the endogenous opioid-mediated regulation of peripheral inflammation and epithelial barrier integrity in IBD-like colitis in IL-10$^{-/-}$ mice. Colitis severity and inflammation parameters, including pro-inflammatory cytokines and bioactive lipids, remained unchanged following naloxone-methiodide-mediated neutralization of peripheral opioid receptors. The frequency of colitogenic Th1/Th17 lymphocytes and Treg was not affected by naloxone-methiodide treatment. In agreement with the Th2-promoting activity of endogenous opioids, piroxicam-treated IL-10$^{-/-}$ mice injected with naloxone-methiodide displayed a significant decrease in mucosal IL-4-producing Th2 lymphocyte frequency.

In line with previous results reporting a beneficial effect of opioids on both intestinal permeability and epithelium recovery [53–55], our study shows that neutralization of endogenous opioid activity in the periphery results in an increase in epithelial cell apoptosis and permeability. Although the pleiotropic distribution of opioid receptors within the intestinal tract allows a number of alternatives to explain the alterations of intestinal permeability by naloxone-methiodide treatment, two hypotheses may be proposed. Bacteria that cross the epithelial barrier to enter into intestinal mucosa may activate, among others, mast cells through toll-like receptors (TLR) and/or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fmlp) receptors [56,57]. In turn, inflammatory mediators released by activated mast cells worsen intestinal epithelial barrier dysfunction and thereby increase intestinal barrier permeability [58,59]. Considering that both TLR and fmlp signaling pathways may be inhibited by opioids [29,58,60], the increase in intestinal permeability observed in naloxone-methiodide-treated mice may be dependent on the neutralization of the opioid effect on mast cell activity. Alternatively, CD95 (Fas/APO-1), constitutively expressed at the basolateral side of intestinal epithelial cells [61], has been reported as protecting the epithelium in colitis [62]. Thus, although CD95-mediated signaling is usually associated with apoptosis, the specific deletion of the CD95 gene or CD95 signaling deficiency in the intestinal epithelium worsens inflammation-induced colonic injury [62]. The targeted deletion of CD95 in intestinal epithelial cells, without any alteration of CD95 expression in immune cells, results in a significant delay in the mucosal regeneration [62]. Given that endogenous opioids may up-regulate CD95 (Fas/APO-1) expression on the cell surface [63–65], it could be speculated that naloxone-methiodide-increased permeability may be dependent on a reduction of CD95 (Fas/APO-1) expression in the intestinal epithelium.

4. Conclusions

Taken together, our study shows that the novel therapeutic strategies, which propose to harness or mimic the mucosal endogenous opioid tone to relieve inflammatory bowel pain, may also be instrumental in improving inflammation-induced colonic epithelial damage.

5. Materials and Methods

5.1. Mice and Naloxone-Methiodide (NLX-Meth) Administration

Eight- to twelve-week-old *IL-10* gene-deficient male (IL-10$^{-/-}$) mice on C57BL/6 genetic background were bred in the animal care facility at Toulouse (INSERM US 006 ANEXPLO/CREFRE, Toulouse, France). Colitis was accelerated/synchronized by adding 150 mg kg^{-1} piroxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug, into standard chow diet for 10 days (SAFE, Scientific Animal Food & Engineering, Rosenberg, Germany) [13]. Mice were intraperitoneally injected with 200 µL of either PBS or 10 mg mL^{-1} naloxone-methiodide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (2 mg/mouse) two days apart for the ten days of piroxicam treatment [63,66].

5.2. Macroscopic Assessment of Colonic Injury

Macroscopic colonic tissue damage was evaluated using a scale ranging from 0 to 11 as follows: erythema (absent (0), length of the area < 1 cm (1), more than 1 cm (2)), edema

(absent (0), mild (1), severe (2)), strictures (absent (0), one (1), two (2), more than two (3)), ulceration (absent (0), present (1)), mucus (present (0), absent (1)), and adhesion (absent (0), moderate (1), severe (2)). Bowel wall thickness was measured with an electronic caliper in the distal part of the colon, at 0.5 cm above the anus.

5.3. Histological Assessment of Colonic Injury

Colonic tissue specimens were excised 2 cm proximal to the anus and immediately transferred into 4% paraformaldehyde to be embedded in paraffin. Five-micrometer colonic sections were then stained with hematoxylin-eosin (HE). Damage scoring was evaluated on a scale ranging from 0 to 12. Inflammatory cell infiltration, epithelial/mucosal alteration (including vasculitis, goblet cell depletion, and crypt abscesses), mucosal architecture alteration (including ulceration and crypt loss), and submucosal edema were graded from 0 to 3 (absent, mild, moderate, and severe) [1].

5.4. Intestinal Epithelial Cell Apoptosis Assessment

Epithelial cell apoptosis was quantified by immunohistochemical staining of activated caspase-3 in colonic biopsies embedded in paraffin (colonic specimen were the same as described above). Slices were incubated with PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma) and 2.5% normal donkey serum (Sigma) for 90 min at room temperature (RT). Slices were then incubated with rabbit anti-activated caspase 3 polyclonal IgG antibodies (Abcam ab13847, Cambridge, UK, 1/200) for 90 min at RT. After extensive washing with PBS, bound antibodies were revealed by adding AlexaFluor 555-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, 1/500) for an additional 90 min period of time at RT. Nuclei were then stained with DAPI for 20 min (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the slices were mounted with ProLong Gold mounting medium (LifeTechnologies). Images were acquired with Zeiss 710 inverted confocal microscope (×20 NA 0.8). Epithelial apoptosis rate was calculated by measuring the area of activated caspase 3-expressing cells relative to the total area of the epithelial cells (inverted threshold 200 and analyze particles) [63].

5.5. Real-Time Quantitative PCR Analysis

Colonic tissue samples were homogenized in 500 µL TRIzol™ Reagent (Sigma). Total RNA was then isolated by using GenElute™ Mammalian total RNA miniprep Kit following the manufacturer's instructions (Sigma). RNA was reverse-transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase using random hexamers for priming. Transcripts encoding hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), TNFα, IFNγ, IL-1β, IL-17, IL-22 were quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction using the following forward and reverse primers: 5′-GTTCTTTGCTGACCTGCTGGAT-3′ and 5′-CCCCGTTGACTGATCATTACAG-3′ for HPRT, 5′-CCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3′ and 5′-GGTCTGGGCCATAGAACTGATG-3′ for TNFα, 5′-CAGCAACAGCAAGGCGAAA-3′ and 5′-AGCTCATTGAATGCTTGGCG-3′ for IFNγ, 5′-ACCTTCCAGGATGAGGACATGAG-3′ and 5′-CATCCCATGAGTCACAGAGGATG-3′ for IL-1β, 5′-TCCAGAAGGCCCTCAGACTA-3′ and 5′-CAGGATCTCTTGCTGGATG-3′ for IL-17, 5′-ACCGCTGATGTGACAGGAGC-3′ and 5′-AGGTGGTGCCTTTCCTGACC-3′ for IL-22. The target gene expression was normalized to the HPRT mRNA and quantified relative to a standard cDNA (calibrator sample) prepared from mouse inflamed colonic tissue using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, where $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ sample} - \Delta C_{T\ calibrator}$ [13,67]. For each sample, mRNA level was then expressed relative to the average of mRNA levels in untreated IL10$^{-/-}$ mice.

5.6. Assessment of Intestinal Paracellular Permeability In Vivo

In vivo, intestinal permeability was assessed by gavaging mice with 12 mg of 4 kDa FITC-dextran (Sigma), a tracer of paracellular permeability. Four hours after gavage, FITC-dextran was quantified in the serum by measuring fluorescence intensity using an

automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan, Männedorf Switzerland). Concentrations were calculated from standard curves of 4 kDa FITC-dextran [68].

5.7. Isolation of Lamina Propria Mononuclear Cells

The intestine was longitudinally opened, cut into small pieces, washed, and incubated twice with RPMI 5% FCS 5 mM EDTA at 37 °C for 15 min. After washing, colonic tissues were digested with 0.02% collagenase VIII (Sigma) for 1 h at 37 °C. The supernatant was then passed through a 70 µm cell strainer and centrifuged. Mononuclear cells were then isolated upon Percoll gradient [2].

5.8. Cytofluorometric Analysis

Mononuclear cells purified from *lamina propria* were stimulated with 0.5 µg mL^{-1} phorbol myristate acetate and 1 µg mL^{-1} ionomycin (Sigma) in the presence of the protein transport inhibitor Brefeldin A (1 µg mL^{-1}, GolgiPlug, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) for 4 h. After washing, the cells were first incubated with blocking buffer (PBS with 1% FCS, 3% normal mouse serum, 3% normal rat serum, 5 mM EDTA, 0.1% NaN_3) containing 5 µg mL^{-1} rat anti-CD16/CD32 mAb (mouse Fc block™, clone 2.4G2, BD Biosciences) for 15 min at room temperature. Cells were incubated with Viability Dye eFluor™ 780 (e-bioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and $CD4^+$ T lymphocytes were stained with both BV510-conjugated rat anti-mouse CD4 (clone RM4-5) and PE-Cy7-conjugated hamster anti-mouse TCR-β chain (clone H57-597) mAbs diluted at the optimal concentration in FACS buffer (PBS 1% FCS, 5 mM EDTA, 0.1% NaN_3) for 30 min on ice. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde in PBS and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm solution (e-Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Intracellular cytokine staining was then performed with Alexa Fluor® 488-conjugated rat anti-IFN-γ (clone XMG1.2), Alexa Fluor® 700-conjugated rat anti-IL-17 (clone TC11-18H10.1), eFluor 450-conjugated rat anti-Foxp3 (clone FJK-16s) and phycoerythrin-conjugated rat anti-IL-4 (clone 11B11) mAbs for 20 min and washed twice with Perm/Wash buffer before analysis. Specific anti-cytokine antibodies and isotype-matched control antibodies were purchased from e-Bioscience, BD Biosciences, and BioLegend (San Diego, CA, USA). Data were acquired on 100,000 cells by forward and side scatter intensity on a Fortessa (BD Biosciences) and further analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA) [45].

5.9. Quantification of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) and Their Metabolites

Colonic biopsies were crushed with a FastPrep-24 Instrument (MP Biomedical, Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) in 200 µL HBSS (Invitrogen) and 5 µL internal standard mixture (Deuterium-labeled compounds) (400 ng mL^{-1}). After two crush cycles (6.5 m s^{-1}, 30 s), 10 µL of suspensions were withdrawn for protein quantification and 0.3 mL of cold methanol (MeOH) were added. Samples were centrifuged at 1016× *g* for 15 min and supernatants were then submitted to solid-phase extraction of lipids using HLB plate (OASIS® HLB mg, 96-well plate, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). At the end of the process, samples were suspended in 10 µL of methanol for liquid chromatography/mass spectrometry analysis. 6-keto-prostaglandin F1 alpha (6-k$PGF_{1\alpha}$), PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, lipoxin A4 (LxA_4), resolvin D2 (RvD2), RvD5, 7-Maresin 1 (7-Mar1), leukotriene B4 (LtB_4), protectin Dx (PDx), and 5-oxoeicosatetraenoic acid (5-oxoETE) were quantified by an ultrahigh-performance liquid chromatography system (UHPLC; Agilent LC1290 Infinity) coupled to an Agilent 6460 triple quadrupole MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with electrospray ionization operating in negative mode. Data were acquired in multiple reaction monitoring (MRM) mode with optimized conditions. Peak detection, integration, and quantitative analysis were performed with MassHunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For each standard, calibration curves were built using 10 solutions at concentrations ranging from 0.95 to 500 ng mL^{-1} [69,70].

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22147387/s1, Figure S1: Effects of peripheral opioid receptor blockade on colon of normal mice.

Author Contributions: Conceptualization, G.D.; Formal Analysis, X.M.-O., M.S., M.B., C.P., A.S., F.B., N.C. and G.D.; Investigation, X.M.-O., M.S., M.B., C.P., C.B., F.B. and N.C.; Resources, C.D.; Writing—Original Draft Preparation, G.D.; Writing—Review & Editing, X.M.-O., M.S., M.B., C.P., A.S., F.B., N.C.; Supervision, G.D.; Funding Acquisition, G.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Paul Sabatier, Toulouse III and the association François Aupetit.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Animal Care and Ethics Committee of US006/CREFE (CEEA-122; application number APAFIS #16385-2018080222083660 v3).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors wish to thank ANEXPLO platforms (UMS 006) animal care facility (X. Collet and R. Balouzat), the platform Aninfimip, an EquipEx ('Equipement d'Excellence') supported by the French government through the Investments for the Future program (ANR-11-EQPX-0003), the Toulouse INSERM Metatoul-Lipidomique Core Facility-MetaboHub ANR-11-INBS-010, the histopathology core facility (F. Capilla), the U1043 flow cytometry facility (F. L'Faqihi-Olive, A-L. Iscache, and V. Duplan-Eche) and cellular imaging core facility (S. Allart and S. Lachambre).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Basso, L.; Boue, J.; Auge, C.; Deraison, C.; Blanpied, C.; Cenac, N.; Lluel, P.; Vergnolle, N.; Dietrich, G. Mobilization of $CD4^+$ T lymphocytes in inflamed mucosa reduces pain in colitis mice: Toward a vaccinal strategy to alleviate inflammatory visceral pain. *Pain* **2018**, *159*, 331–341. [CrossRef]
2. Boue, J.; Basso, L.; Cenac, N.; Blanpied, C.; Rolli-Derkinderen, M.; Neunlist, M.; Vergnolle, N.; Dietrich, G. Endogenous regulation of visceral pain via production of opioids by colitogenic $CD4^+$ T cells in mice. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 166–175. [CrossRef]
3. Hughes, P.A.; Harrington, A.M.; Castro, J.; Liebregts, T.; Adam, B.; Grasby, D.J.; Isaacs, N.J.; Maldeniya, L.; Martin, C.M.; Persson, J.; et al. Sensory neuro-immune interactions differ between irritable bowel syndrome subtypes. *Gut* **2013**, *62*, 1456–1465. [CrossRef]
4. Valdez-Morales, E.; Guerrero-Alba, R.; Ochoa-Cortes, F.; Benson, J.; Spreadbury, I.; Hurlbut, D.; Miranda-Morales, M.; Lomax, A.E.; Vanner, S. Release of endogenous opioids during a chronic IBD model suppresses the excitability of colonic DRG neurons. *Neurogastroenterol. Motil.* **2013**, *25*, 39–46.e34. [CrossRef] [PubMed]
5. Verma-Gandhu, M.; Bercik, P.; Motomura, Y.; Verdu, E.F.; Khan, W.I.; Blennerhassett, P.A.; Wang, L.; El-Sharkawy, R.T.; Collins, S.M. $CD4^+$ T-cell modulation of visceral nociception in mice. *Gastroenterology* **2006**, *130*, 1721–1728. [CrossRef] [PubMed]
6. Verma-Gandhu, M.; Verdu, E.F.; Bercik, P.; Blennerhassett, P.A.; Al-Mutawaly, N.; Ghia, J.E.; Collins, S.M. Visceral pain perception is determined by the duration of colitis and associated neuropeptide expression in the mouse. *Gut* **2007**, *56*, 358–364. [CrossRef] [PubMed]
7. Boue, J.; Blanpied, C.; Brousset, P.; Vergnolle, N.; Dietrich, G. Endogenous opioid-mediated analgesia is dependent on adaptive T cell response in mice. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 5078–5084. [CrossRef]
8. Boue, J.; Blanpied, C.; Djata-Cabral, M.; Pelletier, L.; Vergnolle, N.; Dietrich, G. Immune conditions associated with $CD4^+$ T effector-induced opioid release and analgesia. *Pain* **2012**, *153*, 485–493. [CrossRef]
9. Brack, A.; Rittner, H.L.; Machelska, H.; Shaqura, M.; Mousa, S.A.; Labuz, D.; Zollner, C.; Schafer, M.; Stein, C. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. *Pain* **2004**, *108*, 67–75. [CrossRef] [PubMed]
10. Guerrero-Alba, R.; Valdez-Morales, E.E.; Jimenez-Vargas, N.N.; Bron, R.; Poole, D.; Reed, D.; Castro, J.; Campaniello, M.; Hughes, P.A.; Brierley, S.M.; et al. Co-expression of mu and delta opioid receptors by mouse colonic nociceptors. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 2622–2634. [CrossRef]
11. Machelska, H.; Celik, M.O. Immune cell-mediated opioid analgesia. *Immunol. Lett.* **2020**, *227*, 48–59. [CrossRef]
12. Stein, C.; Schafer, M.; Machelska, H. Attacking pain at its source: New perspectives on opioids. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1003–1008. [CrossRef]

13. Basso, L.; Benamar, M.; Mas-Orea, X.; Deraison, C.; Blanpied, C.; Cenac, N.; Saoudi, A.; Dietrich, G. Endogenous control of inflammatory visceral pain by T cell-derived opioids in IL-10-deficient mice. *Neurogastroenterol. Motil.* **2020**, *32*, e13743. [CrossRef]
14. Basso, L.; Bourreille, A.; Dietrich, G. Intestinal inflammation and pain management. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2015**, *25*, 50–55. [CrossRef]
15. Carbone, S.E.; Poole, D.P. Inflammation without pain: Immune-derived opioids hold the key. *Neurogastroenterol. Motil.* **2020**, *32*, e13787. [CrossRef] [PubMed]
16. Stein, C. New concepts in opioid analgesia. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 765–775. [CrossRef] [PubMed]
17. Feng, J.; Lepetre-Mouelhi, S.; Gautier, A.; Mura, S.; Cailleau, C.; Coudore, F.; Hamon, M.; Couvreur, P. A new painkiller nanomedicine to bypass the blood-brain barrier and the use of morphine. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaau5148. [CrossRef]
18. Mace, G.; Blanpied, C.; Emorine, L.J.; Druet, P.; Dietrich, G. Morphine-like activity of natural human IgG autoantibodies is because of binding to the first and third extracellular loops of the mu-opioid receptor. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20079–20082. [CrossRef] [PubMed]
19. Binning, A.R.; Przesmycki, K.; Sowinski, P.; Morrison, L.M.; Smith, T.W.; Marcus, P.; Lees, J.P.; Dahan, A. A randomised controlled trial on the efficacy and side-effect profile (nausea/vomiting/sedation) of morphine-6-glucuronide versus morphine for post-operative pain relief after major abdominal surgery. *Eur. J. Pain* **2011**, *15*, 402–408. [CrossRef] [PubMed]
20. Hua, S.; Cabot, P.J. Targeted nanoparticles that mimic immune cells in pain control inducing analgesic and anti-inflammatory actions: A potential novel treatment of acute and chronic pain condition. *Pain Physician* **2013**, *16*, E199–E216. [CrossRef] [PubMed]
21. Rodriguez-Gaztelumendi, A.; Spahn, V.; Labuz, D.; Machelska, H.; Stein, C. Analgesic effects of a novel pH-dependent mu-opioid receptor agonist in models of neuropathic and abdominal pain. *Pain* **2018**, *159*, 2277–2284. [CrossRef]
22. Spahn, V.; Del Vecchio, G.; Labuz, D.; Rodriguez-Gaztelumendi, A.; Massaly, N.; Temp, J.; Durmaz, V.; Sabri, P.; Reidelbach, M.; Machelska, H.; et al. A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations. *Science* **2017**, *355*, 966–969. [CrossRef]
23. Jimenez-Vargas, N.N.; Yu, Y.; Jensen, D.D.; Bok, D.D.; Wisdom, M.; Latorre, R.; Lopez, C.; Jaramillo-Polanco, J.O.; Degro, C.; Guzman-Rodriguez, M.; et al. Agonist that activates the micro-opioid receptor in acidified microenvironments inhibits colitis pain without side effects. *Gut* **2021**. online ahead of print. [CrossRef] [PubMed]
24. Auge, C.; Basso, L.; Blanpied, C.; Vergnolle, N.; Game, X.; Chabot, S.; Lluel, P.; Dietrich, G. Pain management in a model of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome by a vaccinal strategy. *Front. Pain Res.* **2021**, *2*, 642706. [CrossRef]
25. Burford, N.T.; Traynor, J.R.; Alt, A. Positive allosteric modulators of the mu-opioid receptor: A novel approach for future pain medications. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 277–286. [CrossRef] [PubMed]
26. Reaux-Le Goazigo, A.; Poras, H.; Ben-Dhaou, C.; Ouimet, T.; Baudouin, C.; Wurm, M.; Melik Parsadaniantz, S. Dual enkephalinase inhibitor PL265: A novel topical treatment to alleviate corneal pain and inflammation. *Pain* **2019**, *160*, 307–321. [CrossRef]
27. Anselmi, L.; Huynh, J.; Duraffourd, C.; Jaramillo, I.; Vegezzi, G.; Saccani, F.; Boschetti, E.; Brecha, N.C.; De Giorgio, R.; Sternini, C. Activation of mu opioid receptors modulates inflammation in acute experimental colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* **2015**, *27*, 509–523. [CrossRef]
28. Philippe, D.; Dubuquoy, L.; Groux, H.; Brun, V.; Chuoi-Mariot, M.T.; Gaveriaux-Ruff, C.; Colombel, J.F.; Kieffer, B.L.; Desreumaux, P. Anti-inflammatory properties of the mu opioid receptor support its use in the treatment of colon inflammation. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 1329–1338. [CrossRef]
29. Plein, L.M.; Rittner, H.L. Opioids and the immune system—Friend or foe. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 2717–2725. [CrossRef]
30. Stein, C.; Kuchler, S. Targeting inflammation and wound healing by opioids. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 303–312. [CrossRef] [PubMed]
31. Berg, D.J.; Zhang, J.; Weinstock, J.V.; Ismail, H.F.; Earle, K.A.; Alila, H.; Pamukcu, R.; Moore, S.; Lynch, R.G. Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* **2002**, *123*, 1527–1542. [CrossRef]
32. Hale, L.P.; Gottfried, M.R.; Swidsinski, A. Piroxicam treatment of IL-10-deficient mice enhances colonic epithelial apoptosis and mucosal exposure to intestinal bacteria. *Inflamm. Bowel Dis.* **2005**, *11*, 1060–1069. [CrossRef] [PubMed]
33. Holgersen, K.; Kvist, P.H.; Markholst, H.; Hansen, A.K.; Holm, T.L. Characterisation of enterocolitis in the piroxicam-accelerated interleukin-10 knock out mouse—A model mimicking inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis* **2014**, *8*, 147–160. [CrossRef] [PubMed]
34. Graham, D.B.; Xavier, R.J. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature* **2020**, *578*, 527–539. [CrossRef] [PubMed]
35. Pigneur, B.; Escher, J.; Elawad, M.; Lima, R.; Buderus, S.; Kierkus, J.; Guariso, G.; Canioni, D.; Lambot, K.; Talbotec, C.; et al. Phenotypic characterization of very early-onset IBD due to mutations in the IL10, IL10 receptor alpha or beta gene: A survey of the Genius Working Group. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 2820–2828. [CrossRef]
36. Begue, B.; Verdier, J.; Rieux-Laucat, F.; Goulet, O.; Morali, A.; Canioni, D.; Hugot, J.P.; Daussy, C.; Verkarre, V.; Pigneur, B.; et al. Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106*, 1544–1555. [CrossRef] [PubMed]
37. Kotlarz, D.; Beier, R.; Murugan, D.; Diestelhorst, J.; Jensen, O.; Boztug, K.; Pfeifer, D.; Kreipe, H.; Pfister, E.D.; Baumann, U.; et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: Implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 347–355. [CrossRef]

38. Madsen, K.L.; Malfair, D.; Gray, D.; Doyle, J.S.; Jewell, L.D.; Fedorak, R.N. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm. Bowel Dis.* **1999**, *5*, 262–270. [CrossRef]
39. Holgersen, K.; Kvist, P.H.; Hansen, A.K.; Holm, T.L. Predictive validity and immune cell involvement in the pathogenesis of piroxicam-accelerated colitis in interleukin-10 knockout mice. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *21*, 137–147. [CrossRef]
40. Rosen, M.J.; Karns, R.; Vallance, J.E.; Bezold, R.; Waddell, A.; Collins, M.H.; Haberman, Y.; Minar, P.; Baldassano, R.N.; Hyams, J.S.; et al. Mucosal Expression of Type 2 and Type 17 Immune Response Genes Distinguishes Ulcerative Colitis From Colon-Only Crohn's Disease in Treatment-Naive Pediatric Patients. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 1345–1357.e1347. [CrossRef]
41. Saruta, M.; Yu, Q.T.; Fleshner, P.R.; Mantel, P.Y.; Schmidt-Weber, C.B.; Banham, A.H.; Papadakis, K.A. Characterization of FOXP3+CD4$^+$ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin. Immunol.* **2007**, *125*, 281–290. [CrossRef]
42. Rubtsov, Y.P.; Rasmussen, J.P.; Chi, E.Y.; Fontenot, J.; Castelli, L.; Ye, X.; Treuting, P.; Siewe, L.; Roers, A.; Henderson, W.R., Jr.; et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* **2008**, *28*, 546–558. [CrossRef]
43. Sznurkowska, K.L.J.; Bryl, E.; Witkowski, J.M.; Hermann-Okoniewska, B.; Landowski, P.; Kosek, M.; Szlagatys-Sidorkiewicz, A. Enhancement of Circulating and Intestinal T Regulatory Cells and Their Expression of Helios and Neuropilin-1 in Children with Inflammatory Bowel Disease. *J. Inflamm. Res.* **2020**, *13*, 995–1005. [CrossRef]
44. Asseman, C.; Mauze, S.; Leach, M.W.; Coffman, R.L.; Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 995–1004. [CrossRef]
45. Basso, L.; Garnier, L.; Bessac, A.; Boue, J.; Blanpied, C.; Cenac, N.; Laffont, S.; Dietrich, G. T-lymphocyte-derived enkephalins reduce Th1/Th17 colitis and associated pain in mice. *J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 215–226. [CrossRef]
46. Roy, S.; Wang, J.; Charboneau, R.; Loh, H.H.; Barke, R.A. Morphine induces CD4$^+$ T cell IL-4 expression through an adenylyl cyclase mechanism independent of the protein kinase A pathway. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 6361–6367. [CrossRef] [PubMed]
47. Roy, S.; Wang, J.; Gupta, S.; Charboneau, R.; Loh, H.H.; Barke, R.A. Chronic morphine treatment differentiates T helper cells to Th2 effector cells by modulating transcription factors GATA 3 and T-bet. *J. Neuroimmunol.* **2004**, *147*, 78–81. [CrossRef]
48. Sacerdote, P.; Manfredi, B.; Gaspani, L.; Panerai, A.E. The opioid antagonist naloxone induces a shift from type 2 to type 1 cytokine pattern in BALB/cJ mice. *Blood* **2000**, *95*, 2031–2036. [CrossRef] [PubMed]
49. Azarang, A.; Mahmoodi, M.; Rajabalian, S.; Shekari, M.A.; Nosratabadi, J.; Rezaei, N. T-helper 1 and 2 serum cytokine assay in chronic opioid addicts. *Eur. Cytokine Netw.* **2007**, *18*, 210–214. [PubMed]
50. Arrieta, M.C.; Madsen, K.; Doyle, J.; Meddings, J. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* **2009**, *58*, 41–48. [CrossRef] [PubMed]
51. Barreau, F.; Madre, C.; Meinzer, U.; Berrebi, D.; Dussaillant, M.; Merlin, F.; Eckmann, L.; Karin, M.; Sterkers, G.; Bonacorsi, S.; et al. Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut* **2010**, *59*, 207–217. [CrossRef] [PubMed]
52. Liu, Z.; Zhang, P.; Ma, Y.; Chen, H.; Zhou, Y.; Zhang, M.; Chu, Z.; Qin, H. Lactobacillus plantarum prevents the development of colitis in IL-10-deficient mouse by reducing the intestinal permeability. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 1353–1361. [CrossRef]
53. Goldsmith, J.R.; Uronis, J.M.; Jobin, C. Mu opioid signaling protects against acute murine intestinal injury in a manner involving Stat3 signaling. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179*, 673–683. [CrossRef] [PubMed]
54. Valle, L.; Pol, O.; Puig, M.M. Intestinal inflammation enhances the inhibitory effects of opioids on intestinal permeability in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 378–387. [PubMed]
55. Valle, L.; Puig, M.M.; Pol, O. Effects of mu-opioid receptor agonists on intestinal secretion and permeability during acute intestinal inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *389*, 235–242. [CrossRef]
56. Harari, Y.; Weisbrodt, N.W.; Moody, F.G. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J. Trauma* **2000**, *49*, 306–313. [CrossRef]
57. Krystel-Whittemore, M.; Dileepan, K.N.; Wood, J.G. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front. Immunol.* **2016**, *6*, 620. [CrossRef]
58. Harari, Y.; Weisbrodt, N.W.; Moody, F.G. The effect of morphine on mast cell-mediated mucosal permeability. *Surgery* **2006**, *139*, 54–60. [CrossRef]
59. Groschwitz, K.R.; Ahrens, R.; Osterfeld, H.; Gurish, M.F.; Han, X.; Abrink, M.; Finkelman, F.D.; Pejler, G.; Hogan, S.P. Mast cells regulate homeostatic intestinal epithelial migration and barrier function by a chymase/Mcpt4-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 22381–22386. [CrossRef]
60. Franchi, S.; Moretti, S.; Castelli, M.; Lattuada, D.; Scavullo, C.; Panerai, A.E.; Sacerdote, P. Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. *Brain Behav. Immun.* **2012**, *26*, 480–488. [CrossRef]
61. Moller, P.; Koretz, K.; Leithauser, F.; Bruderlein, S.; Henne, C.; Quentmeier, A.; Krammer, P.H. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 371–377. [CrossRef]
62. Park, S.M.; Chen, L.; Zhang, M.; Ashton-Rickardt, P.; Turner, J.R.; Peter, M.E. CD95 is cytoprotective for intestinal epithelial cells in colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1063–1070. [CrossRef]
63. Jaume, M.; Jacquet, S.; Cavailles, P.; Mace, G.; Stephan, L.; Blanpied, C.; Demur, C.; Brousset, P.; Dietrich, G. Opioid receptor blockade reduces Fas-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **2004**, *40*, 1136–1143. [CrossRef] [PubMed]
64. Wang, J.; Charboneau, R.; Barke, R.A.; Loh, H.H.; Roy, S. Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 3630–3636. [CrossRef] [PubMed]

65. Yin, D.; Tuthill, D.; Mufson, R.A.; Shi, Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 1423–1428. [CrossRef] [PubMed]
66. Jaume, M.; Laffont, S.; Chapey, E.; Blanpied, C.; Dietrich, G. Opioid receptor blockade increases the number of lymphocytes without altering T cell response in draining lymph nodes in vivo. *J. Neuroimmunol.* **2007**, *188*, 95–102. [CrossRef]
67. Benard, A.; Cavailles, P.; Boue, J.; Chapey, E.; Bayry, J.; Blanpied, C.; Meyer, N.; Lamant, L.; Kaveri, S.V.; Brousset, P.; et al. μ-Opioid receptor is induced by IL-13 within lymph nodes from patients with Sezary syndrome. *J. Investig. Dermatol.* **2010**, *130*, 1337–1344. [CrossRef]
68. Jung, C.; Meinzer, U.; Montcuquet, N.; Thachil, E.; Chateau, D.; Thiebaut, R.; Roy, M.; Alnabhani, Z.; Berrebi, D.; Dussaillant, M.; et al. Yersinia pseudotuberculosis disrupts intestinal barrier integrity through hematopoietic TLR-2 signaling. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2239–2251. [CrossRef]
69. Le Faouder, P.; Baillif, V.; Spreadbury, I.; Motta, J.P.; Rousset, P.; Chene, G.; Guigne, C.; Terce, F.; Vanner, S.; Vergnolle, N.; et al. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J. Chromatogr. B* **2013**, *932*, 123–133. [CrossRef]
70. Pujo, J.; Petitfils, C.; Le Faouder, P.; Eeckhaut, V.; Payros, G.; Maurel, S.; Perez-Berezo, T.; Van Hul, M.; Barreau, F.; Blanpied, C.; et al. Bacteria-derived long chain fatty acid exhibits anti-inflammatory properties in colitis. *Gut* **2020**, *70*, 1088–1097. [CrossRef]

Références Bibliographiques

[1] H. F. Helander and L. Fändriks, “Surface area of the digestive tract – revisited,” *http://dx.doi.org/10.3109/00365521.2014.898326*, vol. 49, no. 6, pp. 681–689, 2014, doi: 10.3109/00365521.2014.898326.

[2] K. K. Reed and R. Wickham, “Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro,” *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 25, no. 1, pp. 3–14, Feb. 2009, doi: 10.1016/J.SONCN.2008.10.002.

[3] E. Tourneur and C. Chassin, “Neonatal immune adaptation of the gut and its role during infections,” *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/270301.

[4] S. M. Karam, “LINEAGE COMMITMENT AND MATURATION OF EPITHELIAL CELLS IN THE GUT,” *Front. Biosci.*, vol. 4, p. 286, 1999.

[5] A. M. Chin, D. R. Hill, M. Aurora, and J. R. Spence, “Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 66, pp. 81–93, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2017.01.011.

[6] S. AH *et al.*, “A direct comparison of mouse and human intestinal development using epithelial gene expression patterns,” *Pediatr. Res.*, vol. 88, no. 1, pp. 66–76, Jul. 2020, doi: 10.1038/S41390-019-0472-Y.

[7] K. Parikh *et al.*, “Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease,” *Nature*, vol. 567, no. 7746, pp. 49–55, 2019, doi: 10.1038/s41586-019-0992-y.

[8] I. Cleynen and D. Laukens, “Cellular diversity in the colon: another brick in the wall,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 16, no. 7, pp. 391–392, 2019, doi: 10.1038/s41575-019-0161-7.

[9] N. Barker *et al.*, “Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5,” *Nature*, vol. 449, no. 7165, pp. 1003–1007, 2007, doi: 10.1038/nature06196.

[10] H. A. McCauley and G. Guasch, “Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia,” *Trends Mol Med*, vol. 21, no. 8, pp. 492–503, 2015, doi: 10.1016/j.molmed.2015.06.003.

[11] A. A. O’Callaghan and S. C. Corr, “Establishing Boundaries: The Relationship That Exists between Intestinal Epithelial Cells and Gut-Dwelling Bacteria,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 12, Dec. 2019, doi: 10.3390/MICROORGANISMS7120663.

[12] J. G. Magalhaes, I. Tattoli, and S. E. Girardin, “The intestinal epithelial barrier: how to

distinguish between the microbial flora and pathogens," *Semin Immunol*, vol. 19, no. 2, pp. 106–115, 2007, doi: 10.1016/j.smim.2006.12.006.

[13] H. Ohno, "Intestinal M cells," *J Biochem*, vol. 159, no. 2, pp. 151–160, 2016, doi: 10.1093/jb/mvv121.

[14] A. Dillon and D. D. Lo, "M cells: Intelligent engineering of mucosal immune surveillance," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JUL, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.01499.

[15] A. JM, C. SM, L. HT, C. SY, K. HJ, and V. BA, "The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity," *Trends Immunol.*, vol. 39, no. 9, pp. 677–696, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.IT.2018.04.002.

[16] Y. S. Kim and S. B. Ho, "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress," *Curr Gastroenterol Rep*, vol. 12, no. 5, pp. 319–330, 2010, doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.

[17] P. Paone and P. D. Cani, "Recent advances in basic science Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?," *Gut*, vol. 69, pp. 2232–2243, 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2020-322260.

[18] R. Latorre, C. Sternini, R. De Giorgio, and B. Greenwood-Van Meerveld, "Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication," *Neurogastroenterol Motil*, vol. 28, no. 5, pp. 620–630, 2016, doi: 10.1111/nmo.12754.

[19] J. B. Furness, L. R. Rivera, H. J. Cho, D. M. Bravo, and B. Callaghan, "The gut as a sensory organ," *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 10, no. 12, pp. 729–740, 2013, doi: 10.1038/nrgastro.2013.180.

[20] von M. J, J. M, L. HE, and L. RM, "Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit," *Nature*, vol. 529, no. 7585, pp. 221–225, Jan. 2016, doi: 10.1038/NATURE16161.

[21] I. Niot, H. Poirier, T. T. Tran, and P. Besnard, "Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties," *Prog Lipid Res*, vol. 48, no. 2, pp. 101–115, 2009, doi: 10.1016/j.plipres.2009.01.001.

[22] H. JA, "New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids,"

Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids, vol. 77, no. 5–6, pp. 355–361, Nov. 2007, doi: 10.1016/J.PLEFA.2007.10.020.

[23] I. Kimura, A. Ichimura, R. Ohue-Kitano, and M. Igarashi, "Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease," *Physiol Rev*, vol. 100, no. 1, pp. 171–210, 2020, doi: 10.1152/physrev.00041.2018.

[24] J. P. Kampf, D. Cupp, and A. M. Kleinfeld, "Different mechanisms of free fatty acid flip-flop and dissociation revealed by temperature and molecular species dependence of transport across lipid vesicles," *J Biol Chem*, vol. 281, no. 30, pp. 21566–21574, 2006, doi: 10.1074/jbc.M602067200.

[25] H. Yaribeygi, Y. Panahi, H. Sahraei, T. P. Johnston and A. Sahebkar " The impact of stress on body function: A review", *EXCLI J*, 1057-1072, 2017, doi: 10.17179/excli2017-480.

[26] V. Cifarelli and N. A. Abumrad, "Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization: Role in Absorption and Gut Homeostasis," *Compr Physiol*, vol. 8, no. 2, pp. 493–507, 2018, doi: 10.1002/cphy.c170026.

[27] M. Buttet, V. Traynard, T. T. Tran, P. Besnard, H. Poirier, and I. Niot, "From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: role of intestinal lipid-binding proteins," *Biochimie*, vol. 96, pp. 37–47, 2014, doi: 10.1016/j.biochi.2013.08.011.

[28] CJ. Masson *et al.*, "Fatty acid- and cholesterol transporter protein expression along the human intestinal tract," *PLoS One*, vol. 5, no. 4, 2010, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0010380.

[29] R. Ehehalt, J. Fullekrug, J. Pohl, A. Ring, T. Herrmann, and W. Stremmel, "Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins," *Mol Cell Biochem*, vol. 284, no. 1–2, pp. 135–140, 2006, doi: 10.1007/s11010-005-9034-1.

[30] R. Ehehalt et al., "Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts)," *BMC Cell Biol.*, vol. 9, Aug. 2008, doi: 10.1186/1471-2121-9-45.

[31] R. Ehehalt et al., "Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 284, no. 1–2, pp. 135–140, Mar. 2006, doi: 10.1007/S11010-005-9034-1.

[32] A. Mayorgas, I. Dotti, and A. Salas, “Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function,” *Mol Nutr Food Res*, p. e2000188, 2020, doi: 10.1002/mnfr.202000188.

[33] F. M. Gribble and F. Reimann, “Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium,” *Annu Rev Physiol*, vol. 78, pp. 277–299, 2016, doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105439.

[34] W. Wahli and L. Michalik, “PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation,” *Trends Endocrinol Metab*, vol. 23, no. 7, pp. 351–363, 2012, doi: 10.1016/j.tem.2012.05.001.

[35] B. N. Okine, J. C. Gaspar, and D. P. Finn, “PPARs and pain,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 176, no. 10, pp. 1421–1442, May 2019, doi: 10.1111/BPH.14339.

[36] H. Y. P. Oh, V. Visvalingam, and W. Wahli, “The PPAR-microbiota-metabolic organ trilogy to fine-tune physiology,” *FASEB J*, vol. 33, no. 9, pp. 9706–9730, 2019, doi: 10.1096/fj.201802681RR.

[37] J. Korbecki, R. Bobiński, and · Mieczysław Dutka, “Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors,” vol. 68, pp. 443–458, 2019, doi: 10.1007/s00011-019-01231-1.

[38] T. Varga et al., “PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1812, no. 8, pp. 1007–1022, Aug. 2011, doi: 10.1016/J.BBADIS.2011.02.014.

[39] B. Grygiel-Górniak, “Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications: a review,” *Nutr. J.*, vol. 13, pp. 1–10, 2014, doi: 10.1186/1475-2891-13-17.

[40] M. Hamblin *et al.*, “Comprehensive Invited Review PPARs and the Cardiovascular System.”

[41] J. R. Turner, “Intestinal mucosal barrier function in health and disease,” *Nat. Rev. Immunol. 2009 911*, vol. 9, no. 11, pp. 799–809, Nov. 2009, doi: 10.1038/nri2653.

[42] M. L. Forchielli and W. A. Walker, “The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence,” *Br J Nutr*, vol. 93 Suppl 1, pp. S41-8, 2005, doi: 10.1079/bjn20041356.

[43] N. Vergnolle and C. Cirillo, “Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function,” *Physiol.*, vol. 33, no. 4, pp. 269–280, 2018, doi: 10.1152/physiol.00009.2018.

[44] V. Snoeck, B. Goddeeris, and E. Cox, “The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake,” *Microbes Infect*, vol. 7, no. 7–8, pp. 997–1004, 2005, doi: 10.1016/j.micinf.2005.04.003.

[45] L. W. Peterson and D. Artis, “Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis,” *Nat Rev Immunol*, vol. 14, no. 3, pp. 141–153, 2014, doi: 10.1038/nri3608.

[46] AS. Yap et al., “Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 13, pp. 119–146, 1997, doi: 10.1146/ANNUREV.CELLBIO.13.1.119.

[47] AP. Kowalczyk and KJ Green, “Structure, function, and regulation of desmosomes,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 116, pp. 95–118, 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4.

[48] GW. Laurie, CP. Leblond, and GR. Martin, “Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes,” *J. Cell Biol.*, vol. 95, no. 1, pp. 340–344, Oct. 1982, doi: 10.1083/JCB.95.1.340.

[49] G. C. Hansson and M. E. Johansson, “The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria,” *Gut Microbes*, vol. 1, no. 1, pp. 51–54, 2010, doi: 10.4161/gmic.1.1.10470.

[50] M. E. Johansson *et al.*, “Composition and functional role of the mucus layers in the intestine,” *Cell Mol Life Sci*, vol. 68, no. 22, pp. 3635–3641, 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0822-3.

[51] M. E. Johansson, M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, and G. C. Hansson, “The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 39, pp. 15064–15069, 2008, doi: 10.1073/pnas.0803124105.

[52] MEV. Johansson and GC. Hansson, “Immunological aspects of intestinal mucus and mucins,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 10, pp. 639–649, Oct. 2016, doi: 10.1038/NRI.2016.88.

[53] G. Diamond, N. Beckloff, A. Weinberg, and K. O. Kisich, “The roles of antimicrobial peptides in innate host defense,” *Curr Pharm Des*, vol. 15, no. 21, pp. 2377–2392, 2009, doi: 10.2174/138161209788682325.

[54] G. Blyth, L. Connors, C. Fodor, and E. Cobo, “The Network of Colonic Host Defense Peptides as an Innate Immune Defense Against Enteropathogenic Bacteria,” *Front. Immunol.*, vol. 11, May

2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.00965.

[55] M. T. Abreu, “Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function,” *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 2, pp. 131–144, 2010, doi: 10.1038/nri2707.

[56] A. E. Price *et al.*, “A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns In Brief,” *Immunity*, vol. 49, pp. 560–575, 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.016.

[57] J. B. Furness, B. P. Callaghan, L. R. Rivera, and H. J. Cho, “The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 817, pp. 39–71, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_3.

[58] Y. Hou, F. Moreau, and K. Chadee, “PPARγ is an E3 ligase that induces the degradation of NFκB/p65,” *Nat. Commun.*, vol. 3, 2012, doi: 10.1038/NCOMMS2270.

[59] H. Ohno, “JB Special Review-Crosstalk between the Intestinal Immune System and Gut Commensal Microbiota Intestinal M cells,” doi: 10.1093/jb/mvv121.

[60] R. Okumura and K. Takeda, “Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 49, no. 5, p. e338, May 2017, doi: 10.1038/EMM.2017.20.

[61] J. Maghales et al., “The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens,” *Semin. Immunol.*, vol. 19, no. 2, pp. 106–115, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.SMIM.2006.12.006.

[62] A. M. Mowat and W. W. Agace, “Regional specialization within the intestinal immune system,” *Nat. Rev. Immunol. 2014 1410*, vol. 14, no. 10, pp. 667–685, Sep. 2014, doi: 10.1038/nri3738.

[63] M. B. Geuking, Y. Köller, S. Rupp, and K. D. McCoy, “The interplay between the gut microbiota and the immune system,” *Gut Microbes*, vol. 5, no. 3, 2014, doi: 10.4161/GMIC.29330.

[64] M. L. Hermiston and J. I. Gordon, “Inflammatory Bowel Disease and Adenomas in Mice Expressing a Dominant Negative N-Cadherin,” *Science (80-.).*, vol. 270, no. 5239, pp. 1203–1207, Nov. 1995, doi: 10.1126/SCIENCE.270.5239.1203.

[65] P. Kiesler, I. J. Fuss, and W. Strober, “Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases,” *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 1, pp. 154–170, 2015, doi:

10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.

[66] B. Chassaing, J. D. Aitken, M. Malleshappa, and M. Vijay-Kumar, “Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice,” doi: 10.1002/0471142735.im1525s104.

[67] Y. Yan *et al.*, “Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis,” *PLoS One*, vol. 4, no. 6, Jun. 2009, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0006073.

[68] C. Ma, R. Vasu, and H. Zhang, “The Role of Long-Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease,” 2019.

[69] Z. Al Nabhani and G. Eberl, “Imprinting of the immune system by the microbiota early in life,” *Mucosal Immunology*. 2020, doi: 10.1038/s41385-020-0257-y.

[70] M. Perše and A. Cerar, “Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, p. 13, 2012, doi: 10.1155/2012/718617.

[71] J. B. Furness, “The enteric nervous system and neurogastroenterology,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 9, no. 5, pp. 286–294, 2012, doi: 10.1038/nrgastro.2012.32.

[72] V. Sasselli, V. Pachnis, and A. J. Burns, “The enteric nervous system,” *Dev Biol*, vol. 366, no. 1, pp. 64–73, 2012, doi: 10.1016/j.ydbio.2012.01.012.

[73] N. J. Spencer and H. Hu, “Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 17, no. 6, pp. 338–351, 2020, doi: 10.1038/s41575-020-0271-2.

[74] J. B. Furness, C. Jones, K. Nurgali, and N. Clerc, “Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine,” *Prog Neurobiol*, vol. 72, no. 2, pp. 143–164, 2004, doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.12.004.

[75] T. Uesaka et al., “Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut,” *Dev. Biol.*, vol. 417, no. 2, pp. 158–167, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.YDBIO.2016.04.016.

[76] M. Rao and M. D. Gershon, “Enteric nervous system development: what could possibly go wrong?,” *Nat Rev Neurosci*, vol. 19, no. 9, pp. 552–565, 2018, doi: 10.1038/s41583-018-0041-0.

[77] A. Kostouros, I. Koliarakis, K. Natsis, D. A. Spandidos, A. Tsatsakis, and J. Tsiaoussis, “Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders (Review),” *Int J Mol Med*, vol. 46, no. 1, pp. 27–57, 2020, doi: 10.3892/ijmm.2020.4583.

[78] D. Grundy and M. Schemann, “Enteric nervous system,” *Curr Opin Gastroenterol*, vol. 22, no. 2, pp. 102–110, 2006, doi: 10.1097/01.mog.0000208459.46395.16.

[79] C. Knauf, A. Abot, E. Wemelle, and P. D. Cani, “Targeting the Enteric Nervous System to Treat Metabolic Disorders? ‘Enterosynes’ as Therapeutic Gut Factors,” *Neuroendocrinology*, vol. 110, no. 1–2, pp. 139–146, 2020, doi: 10.1159/000500602.

[80] J. B. Furness, “Types of neurons in the enteric nervous system,” *J Aut. Nerv Syst*, vol. 81, no. 1–3, pp. 87–96, 2000, doi: 10.1016/s0165-1838(00)00127-2.

[81] N. Kruepunga, J. Hikspoors, C. J. M. Hulsman, G. M. C. Mommen, S. E. Kohler, and W. H. Lamers, “Development of extrinsic innervation in the abdominal intestines of human embryos,” *J Anat*, vol. 237, no. 4, pp. 655–671, 2020, doi: 10.1111/joa.13230.

[82] X. Niu *et al.*, “Mapping of Extrinsic Innervation of the Gastrointestinal Tract in the Mouse Embryo,” *J Neurosci*, vol. 40, no. 35, pp. 6691–6708, 2020, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0309-20.2020.

[83] S. Sikandar and A. H. Dickenson, “Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs,” *Curr Opin Support Palliat Care*, vol. 6, no. 1, pp. 17–26, 2012, doi: 10.1097/SPC.0b013e32834f6ec9.

[84] A. M. Drewes, A. E. Olesen, A. D. Farmer, E. Szigethy, V. Rebours, and S. S. Olesen, “Gastrointestinal pain,” *Nat Rev Dis Prim.*, vol. 6, no. 1, p. 1, 2020, doi: 10.1038/s41572-019-0135-7.

[85] B. Feng and T. Guo, “Visceral pain from colon and rectum: the mechanotransduction and biomechanics,” *J Neural Transm*, vol. 127, no. 4, pp. 415–429, 2020, doi: 10.1007/s00702-019-02088-8.

[86] L. Grundy, A. Erickson, and S. M. Brierley, “Visceral Pain,” *Annu Rev Physiol*, vol. 81, pp. 261–284, 2019, doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114525.

[87] F. Cervero, “Visceral versus somatic pain: similarities and differences,” *Dig Dis*, vol. 27 Suppl 1, pp. 3–10, 2009, doi: 10.1159/000268115.

[88] J. R. F. Hockley, E. S. J. Smith, and D. C. Bulmer, “Human visceral nociception: findings from translational studies in human tissue,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 315, no. 4, pp. G464–G472, 2018, doi: 10.1152/ajpgi.00398.2017.

[89] A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, and D. Julius, “Cellular and molecular mechanisms of pain,” *Cell*, vol. 139, no. 2, pp. 267–284, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

[90] S. M. Brierley, R. C. Jones 3rd, G. F. Gebhart, and L. A. Blackshaw, “Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice,” *Gastroenterology*, vol. 127, no. 1, pp. 166–178, 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2004.04.008.

[91] J. Hockley *et al.*, “Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron,” *Gut*, vol. 68, no. 4, pp. 633–644, Apr. 2019, doi: 10.1136/GUTJNL-2017-315631.

[92] E. Perna *et al.*, “Effect of resolvins on sensitisation of TRPV1 and visceral hypersensitivity in IBS,” *Gut*, 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2020-321530.

[93] M. G. Tsagareli and I. Nozadze, “An overview on transient receptor potential channels superfamily,” *Behav Pharmacol*, vol. 31, no. 5, pp. 413–434, 2020, doi: 10.1097/FBP.0000000000000524.

[94] R. Gonzalez-Ramirez, Y. Chen, W. B. Liedtke, and S. L. Morales-Lazaro, “TRP Channels and Pain,” in *Neurobiology of TRP Channels*, T. L. R. Emir, Ed. Boca Raton (FL), 2017, pp. 125–147.

[95] X. Yu, M. Yu, Y. Liu, and S. Yu, “TRP channel functions in the gastrointestinal tract,” *Semin Immunopathol*, vol. 38, no. 3, pp. 385–396, 2016, doi: 10.1007/s00281-015-0528-y.

[96] P. Geppetti, N. A. Veldhuis, T. M. Lieu, and N. W. Bunnett, “G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch,” *Neuron*, vol. 88, no. 4, pp. 635–649, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.NEURON.2015.11.001.

[97] A. M. Drewes, A. E. Olesen, A. D. Farmer, E. Szigethy, V. Rebours, and S. S. Olesen, “Gastrointestinal pain,” *Nat. Rev. Dis. Prim. 2020 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2020, doi: 10.1038/S41572-019-0135-7.

[98] I. Salzer, S. Ray, K. Schicker, and S. Boehm, “Nociceptor Signalling through ion Channel Regulation via GPCRs,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 10, May 2019, doi: 10.3390/IJMS20102488.

[99] E. Farré-Maduell and C. Casals-Pascual, “The origins of gut microbiome research in Europe:

From Escherich to Nissle," *Hum. Microbiome J.*, vol. 14, p. 100065, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.HUMIC.2019.100065.

[100] M. Fassarella, E. E. Blaak, J. Penders, A. Nauta, H. Smidt, and E. G. Zoetendal, "Gut microbiome stability and resilience: Elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health," *Gut*. 2021, doi: 10.1136/gutjnl-2020-321747.

[101] T. L. A. Nguyen, S. Vieira-Silva, A. Liston, and J. Raes, "How informative is the mouse for human gut microbiota research?," *DMM Dis. Model. Mech.*, 2015, doi: 10.1242/dmm.017400.

[102] L. Santarpia and F. Contaldo, "Gut Flora in Intestinal and Extraintestinal Diseases: A General Overview and the Effects of Artificial Nutrition," *Curr. Nutr. Food Sci.*, 2009, doi: 10.2174/157340109789007135.

[103] J. Durack and S. V Lynch, "The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy," *J. Exp. Med*, vol. 216, no. 1, pp. 20–40, 2018, doi: 10.1084/jem.20180448.

[104] A. Ratsika, M. C. Codagnone, S. O'mahony, C. Stanton, and J. F. Cryan, "Priming for life: Early life nutrition and the microbiota-gut-brain axis," *Nutrients*. 2021, doi: 10.3390/nu13020423.

[105] T. F. S. Bastiaanssen *et al.*, "Volatility as a Concept to Understand the Impact of Stress on the Microbiome," *Psychoneuroendocrinology*, 2021, doi: 10.1016/j.psyneuen.2020.105047.

[106] R. Sender, S. Fuchs, and R. Milo, "Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans," *Cell*. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.

[107] M. F. Laursen, M. I. Bahl, K. F. Michaelsen, and T. R. Licht, "First foods and gut microbes," *Front. Microbiol.*, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00356.

[108] G. P. Donaldson, S. M. Lee, and S. K. Mazmanian, "Gut biogeography of the bacterial microbiota," *Nat. Rev. Microbiol. 2015 141*, vol. 14, no. 1, pp. 20–32, Oct. 2015, doi: 10.1038/nrmicro3552.

[109] H. J. Flint, K. P. Scott, P. Louis, and S. H. Duncan, "The role of the gut microbiota in nutrition and health," *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2012, doi: 10.1038/nrgastro.2012.156.

[110] A. M. O'Hara and F. Shanahan, "The gut flora as a forgotten organ," *EMBO Rep.*, vol. 7, no. 7, pp. 688–693, Jul. 2006, doi: 10.1038/SJ.EMBOR.7400731.

[111] A. Hussain, A. Z. Ansari, and R. Ahmad, “Microbial biofilms: Human mucosa and intestinal microbiota,” in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms Current Research and Future Trends in Microbial Biofilms*, 2019.

[112] F. Hugenholtz and W. de Vos, “Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 75, no. 1, pp. 149–160, Jan. 2018, doi: 10.1007/S00018-017-2693-8.

[113] J. C. Park and S.-H. Im, “Of men in mice: the development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics,” *Exp. Mol. Med. 2020 529*, vol. 52, no. 9, pp. 1383–1396, Sep. 2020, doi: 10.1038/s12276-020-0473-2.

[114] S. M. Jandhyala, R. Talukdar, C. Subramanyam, H. Vuyyuru, M. Sasikala, and D. N. Reddy, “Role of the normal gut microbiota,” *World J. Gastroenterol.*, 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.

[115] V. Tremaroli and F. Bäckhed, “Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism,” *Nature*. 2012, doi: 10.1038/nature11552.

[116] S. Collins and A. Patterson, “The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 10, no. 1, pp. 19–32, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.APSB.2019.12.001.

[117] I. Adlerberth and A. E. Wold, “Establishment of the gut microbiota in Western infants,” *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*. 2009, doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x.

[118] J. P. Langhendries, “Colonisation bactérienne de l’intestin dans l’enfance : pourquoi y accorder autant d’importance ?,” *Archives de Pediatrie*. 2006, doi: 10.1016/j.arcped.2006.09.018.

[119] M. G. Dominguez-Bello *et al.*, “Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, doi: 10.1073/pnas.1002601107.

[120] MJ. Butel et al. , “The developing gut microbiota and its consequences for health,” *J. Dev. Orig. Health Dis.*, vol. 9, no. 6, pp. 590–597, Dec. 2018, doi: 10.1017/S2040174418000119.

[121] K. FR and C. GAM, “Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment,” *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 35, no. 3, pp. 386–405, Jun. 2020, doi: 10.1002/NCP.10490.

[122] C. Milani *et al.*, “The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 81, no. 4, Dec. 2017, doi: 10.1128/MMBR.00036-17.

[123] J. Roswall *et al.*, “Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life,” *Cell Host Microbe*, 2021, doi: 10.1016/j.chom.2021.02.021.

[124] F. Bäckhed *et al.*, “Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life,” *Cell Host Microbe*, 2015, doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.

[125] K. M. Kennedy *et al.*, “Fetal meconium does not have a detectable microbiota before birth,” *Nat. Microbiol.*, 2021, doi: 10.1038/s41564-021-00904-0.

[126] H. E. Vuong *et al.*, “The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice,” *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2745-3.

[127] M. G. De Agüero *et al.*, “The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development,” *Science (80-.).*, 2016, doi: 10.1126/science.aad2571.

[128] I. Kimura *et al.*, “Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice,” doi: 10.1126/science.aaw8429.

[129] C. Brosseau *et al.*, “Prebiotic Supplementation During Pregnancy Modifies the Gut Microbiota and Increases Metabolites in Amniotic Fluid, Driving a Tolerogenic Environment In Utero,” *Front. Immunol.*, vol. 12, Jul. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.712614.

[130] J. M. Rodríguez *et al.*, “The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life,” *Microb. Ecol. Heal. Dis.*, 2015, doi: 10.3402/mehd.v26.26050.

[131] C. Palmer, E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, and P. O. Brown, “Development of the human infant intestinal microbiota,” *PLoS Biol.*, 2007, doi: 10.1371/journal.pbio.0050177.

[132] P. Zimmermann and N. Curtis, “Factors Influencing the Intestinal Microbiome during the First Year of Life,” *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2018, doi: 10.1097/INF.0000000000002103.

[133] S. B. Busi *et al.*, “Persistence of birth mode-dependent effects on gut microbiome composition, immune system stimulation and antimicrobial resistance during the first year of life,” *ISME Commun.*, 2021, doi: 10.1038/s43705-021-00003-5.

[134] O. Sakwinska *et al.*, “Does the maternal vaginal microbiota play a role in seeding the microbiota of neonatal gut and nose?,” *Benef. Microbes*, 2017, doi: 10.3920/BM2017.0064.

[135] E. Decker *et al.*, “Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children,” *Pediatrics*, 2010, doi: 10.1542/peds.2009-2260.

[136] K. Mårild, O. Stephansson, S. Montgomery, J. A. Murray, and J. F. Ludvigsson, “Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: A nationwide case-control study,” *Gastroenterology*, 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.047.

[137] C. S. Algert, A. McElduff, J. M. Morris, and C. L. Roberts, “Perinatal risk factors for early onset of Type 1 diabetes in a 2000-2005 birth cohort,” *Diabet. Med.*, 2009, doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02878.x.

[138] J. Blustein *et al.*, “Association of caesarean delivery with child adiposity from age 6 weeks to 15 years,” *Int. J. Obes.*, 2013, doi: 10.1038/ijo.2013.49.

[139] S. Y. Huh *et al.*, “Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children: A prospective cohort study,” *Arch. Dis. Child.*, 2012, doi: 10.1136/archdischild-2011-301141.

[140] E. Rutayisire, K. Huang, Y. Liu, and F. Tao, “The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants’ life: A systematic review,” *BMC Gastroenterol.*, 2016, doi: 10.1186/s12876-016-0498-0.

[141] K. P. Gopalakrishna and T. W. Hand, “Influence of maternal milk on the neonatal intestinal microbiome,” *Nutrients*. 2020, doi: 10.3390/nu12030823.

[142] E. Cortes-Macías *et al.*, “Maternal Diet Shapes the Breast Milk Microbiota Composition and Diversity: Impact of Mode of Delivery and Antibiotic Exposure,” doi: 10.1093/jn/nxaa310.

[143] Sordillo J. *et al.*, “Factors influencing the infant gut microbiome at age 3-6 months: Findings from the ethnically diverse Vitamin D Antenatal Asthma Reduction Trial (VDAART),” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 139, no. 2, pp. 482-491.e14, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.JACI.2016.08.045.

[144] R. Martin *et al.*, “Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota,” *PLoS One*, vol. 11, no. 6, Jun. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0158498.

[145] M. Jaggar *et al*., “You’ve got male: Sex and the microbiota-gut-brain axis across the lifespan,”

Front. Neuroendocrinol., vol. 56, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.YFRNE.2019.100815.

[146] Y. Fan and O. Pedersen, "Gut microbiota in human metabolic health and disease," *Nature Reviews Microbiology*. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-0433-9.

[147] J. de la cuesta-Zuluaga *et al.*, "Age- and Sex-Dependent Patterns of Gut Microbial Diversity in Human Adults," *mSystems*, vol. 4, no. 4, Aug. 2019, doi: 10.1128/MSYSTEMS.00261-19.

[148] a. Koliada *et al.*, "Sex differences in the phylum-level human gut microbiota composition," *BMC Microbiol.*, vol. 21, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12866-021-02198-Y.

[149] E. Biagi *et al.*, "Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians," *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0010667.

[150] M. Fassarella, E. E. Blaak, J. Penders, A. Nauta, H. Smidt, and E. G. Zoetendal, "Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health," *Gut*, 2020, doi: 10.1136/gutjnl-2020-321747.

[151] M. E. Sanders, D. J. Merenstein, G. Reid, G. R. Gibson, and R. A. Rastall, "Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic," *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2019, doi: 10.1038/s41575-019-0173-3.

[152] E. Quigley, "Prebiotics and Probiotics in Digestive Health," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 17, no. 2, pp. 333–344, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.CGH.2018.09.028.

[153] E. Quigley, "Recent advances in modulating the microbiome," *F1000Research*, vol. 9, 2020, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.20204.1.

[154] D. Davani-Davari *et al.*, "Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications," *Foods (Basel, Switzerland)*, vol. 8, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.3390/FOODS8030092.

[155] G.Gibson and MB. Roberfroid, "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics," *J. Nutr.*, vol. 125, no. 6, pp. 1401–1412, 1995, doi: 10.1093/JN/125.6.1401.

[156] G. Chen, C. Li, and K. Chen, "Fructooligosaccharides: A Review on Their Mechanisms of Action and Effects," in *Studies in Natural Products Chemistry*, 2016.

[157] M. Sabater-Molina, E. Larqué, F. Torrella, and S. Zamora, “Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health,” *J. Physiol. Biochem. 2009 653*, vol. 65, no. 3, pp. 315–328, Sep. 2009, doi: 10.1007/BF03180584.

[158] A. Rivière *et al.*, “Complementary Mechanisms for Degradation of Inulin-Type Fructans and Arabinoxylan Oligosaccharides among Bifidobacterial Strains Suggest Bacterial Cooperation,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 84, no. 9, May 2018, doi: 10.1128/AEM.02893-17.

[159] O. Clermont, S. Bonacorsi, and E. Bingen, “Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.

[160] O. Clermont *et al.,* “Development of an allele-specific PCR for Escherichia coli B2 sub-typing, a rapid and easy to perform substitute of multilocus sequence typing,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 101, no. 1, pp. 24–27, 2014, doi: 10.1016/J.MIMET.2014.03.008.

[161] F. Nowrouzian *et al.*, “Escherichia coli strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants,” *J. Infect. Dis.*, vol. 191, no. 7, pp. 1078–1083, Apr. 2005, doi: 10.1086/427996.

[162] U. Sonnenborn, “Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: History of a special Escherichia coli strain with probiotic properties,” *FEMS Microbiology Letters*. 2016, doi: 10.1093/femsle/fnw212.

[163] D. M. Gordon, C. L. O’Brien, and P. Pavli, “Escherichia coli diversity in the lower intestinal tract of humans,” *Environ. Microbiol. Rep.*, 2015, doi: 10.1111/1758-2229.12300.

[164] Z. D. Blount, “The unexhausted potential of E. coli,” *eLife*. 2015, doi: 10.7554/eLife.05826.

[165] T. A. Oelschlaeger, “Mechanisms of probiotic actions - A review,” *International Journal of Medical Microbiology*. 2010, doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.005.

[166] A. Grabig *et al.*, “Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways,” *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 7, pp. 4075–4082, Jul. 2006, doi: 10.1128/IAI.01449-05.

[167] C. De Maesschalck *et al.*, “Faecalicoccus acidiformans gen. nov., Sp. nov., Isolated from the chicken caecum, And reclassification of streptococcus pleomorphus (barnes et al. 1977),

Eubacterium biforme (eggerth 1935) and eubacterium cylindroides (cato et al. 1974) as faecalicoccus p," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, doi: 10.1099/ijs.0.064626-0.

[168] A. Schwiertz, G. Le Blay, and M. Blaut, "Quantification of different Eubacterium spp. in human fecal samples with species-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, doi: 10.1128/AEM.66.1.375-382.2000.

[169] A. Kageyama and Y. Benno, "Rapid detection of human fecal Eubacterium species and related genera by nested PCR method," *Microbiol. Immunol.*, 2001, doi: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb02624.x.

[170] E. Zagato *et al.*, "Endogenous murine microbiota member Faecalibaculum rodentium and its human homologue protect from intestinal tumour growth," *Nat. Microbiol.*, 2020, doi: 10.1038/s41564-019-0649-5.

[171] A. Mukherjee, C. Lordan, R. P. Ross, and P. D. Cotter, "Gut microbes from the phylogenetically diverse genus Eubacterium and their various contributions to gut health," *Gut Microbes*, vol. 12, no. 1, Nov. 2020, doi: 10.1080/19490976.2020.1802866.

[172] K. H. Schleifer and W. Ludwig, "Phylogeny of the Genus Lactobacillus and Related Genera," *Syst. Appl. Microbiol.*, 1995, doi: 10.1016/S0723-2020(11)80404-2.

[173] A. Di Cerbo *et al.*, "Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli," *J. Clin. Pathol.*, vol. 69, no. 3, pp. 187–203, Mar. 2016, doi: 10.1136/JCLINPATH-2015-202976.

[174] D. D. Heeney, M. G. Gareau, and M. L. Marco, "Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride?," *Current Opinion in Biotechnology*. 2018, doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.004.

[175] J. Plaza-Diaz, F. J. Ruiz-Ojeda, M. Gil-Campos, and A. Gil, "Mechanisms of Action of Probiotics," *Adv. Nutr.*, vol. 10, no. Suppl 1, p. S49, Jan. 2019, doi: 10.1093/ADVANCES/NMY063.

[176] W. F. van Zyl, S. M. Deane, and L. M. T. Dicks, "Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria," *Gut Microbes*, vol. 12, no. 1, Nov. 2020, doi: 10.1080/19490976.2020.1831339.

[177] Z. Sun *et al.*, "Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera," *Nat. Commun. 2015 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–

13, Sep. 2015, doi: 10.1038/ncomms9322.

[178] J. Zheng *et al.*, “A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2020, doi: 10.1099/ijsem.0.004107.

[179] S. H. Park and K. Itoh, “Species-specific oligonucleotide probes for the detection and identification of Lactobacillus isolated from mouse faeces,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 99, no. 1, pp. 51–57, Jul. 2005, doi: 10.1111/J.1365-2672.2005.02584.X.

[180] L. Y *et al.*, “Lactobacillus rescues postnatal neurobehavioral and microglial dysfunction in a model of maternal microbiome dysbiosis,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 81, pp. 617–629, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.BBI.2019.07.025.

[181] M. Isani *et al.*, “Lactobacillus murinus HF12 colonizes neonatal gut and protects rats from necrotizing enterocolitis,” *PLoS One*, vol. 13, no. 6, p. e0196710, Jun. 2018, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0196710.

[182] F. Pan *et al.*, “Predominant gut Lactobacillus murinus strain mediates anti-inflammaging effects in calorie-restricted mice,” *Microbiome 2018 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–17, Mar. 2018, doi: 10.1186/S40168-018-0440-5.

[183] S. JR *et al.*, “Preventing dysbiosis of the neonatal mouse intestinal microbiome protects against late-onset sepsis,” *Nat. Med.*, vol. 25, no. 11, pp. 1772–1782, Nov. 2019, doi: 10.1038/S41591-019-0640-Y.

[184] L. V. McFarland, C. T. Evans, and E. J. C. Goldstein, “Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: A systematic review and meta-analysis,” *Frontiers in Medicine*. 2018, doi: 10.3389/fmed.2018.00124.

[185] A. Moya and M. Ferrer, “Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance,” *Trends Microbiol*, vol. 24, no. 5, pp. 402–413, 2016, doi: 10.1016/j.tim.2016.02.002.

[186] L. Tian *et al.*, “Deciphering functional redundancy in the human microbiome,” *Nat. Commun. 2020 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-19940-1.

[187] A. Visconti *et al.*, “Interplay between the human gut microbiome and host metabolism,” doi:

10.1038/s41467-019-12476-z.

[188] C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, and R. Knight, “Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota,” 2012, doi: 10.1038/nature11550.

[189] D. Rojo *et al.*, “Clostridium difficile heterogeneously impacts intestinal community architecture but drives stable metabolome responses,” *ISME J.*, vol. 9, pp. 2206–2220, 2015, doi: 10.1038/ismej.2015.32.

[190] B. S. Beresford-Jones *et al.*, “Functional and taxonomic comparison of mouse and human gut microbiotas using extensive culturing and metagenomics,” *bioRxiv*, 2021.

[191] S. Louca *et al.*, “Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome,” *Science*, vol. 353, no. 6305, pp. 1272–1277, Sep. 2016, doi: 10.1126/SCIENCE.AAF4507.

[192] C. Huttenhower *et al.*, “Structure, function and diversity of the healthy human microbiome,” *Nature*, 2012, doi: 10.1038/nature11234.

[193] S. Salminen *et al.*, “The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, doi: 10.1038/s41575-021-00440-6.

[194] S. Yasuda *et al.*, “Elucidation of Gut Microbiota-Associated Lipids Using LC-MS/MS and 16S rRNA Sequence Analyses,” *iScience*, vol. 23, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.ISCI.2020.101841.

[195] van T. IAM, B. S, de J. WJ, and S. J, “Painful interactions: Microbial compounds and visceral pain,” *Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis.*, vol. 1866, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.BBADIS.2019.165534.

[196] L. VN, K. AD, and C. IM, “Mechanisms of microbial-neuronal interactions in pain and nociception,” *Neurobiol. pain (Cambridge, Mass.)*, vol. 9, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.YNPAI.2020.100056.

[197] F. Hosseinkhani, A. Heinken, I. Thiele, P. W. Lindenburg, A. C. Harms, and T. Hankemeier, “The contribution of gut bacterial metabolites in the human immune signaling pathway of non-communicable diseases,” 2021, doi: 10.1080/19490976.2021.1882927.

[198] M. J. Morowitz, E. Carlisle, J. C. Alverdy, and H. Lincoln Thompson Professor, “Contributions of

Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill," *Surg Clin North Am*, vol. 91, no. 4, pp. 771–785, 2011, doi: 10.1016/j.suc.2011.05.001.

[199] M. J. Hill, "Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis," *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 6, no. SUPPL. 1, 1997, doi: 10.1097/00008469-199703001-00009.

[200] J. G. LeBlanc, C. Milani, G. S. de Giori, F. Sesma, D. van Sinderen, and M. Ventura, "Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 2, pp. 160–168, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.COPBIO.2012.08.005.

[201] P. Bercik, S. M. Collins, and E. F. Verdu, "Microbes and the gut-brain axis," doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01906.x.

[202] P. Di Martino, R. Fursy, L. Bret, B. Sundararaju, and R. S. Phillips, "Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of Escherichia coli and other indole-producing bacteria," 2003, doi: 10.1139/W03-056.

[203] S. Gosh *et al.,* "Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites," *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11, no. 5, pp. 1463–1482, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JCMGH.2021.02.007.

[204] F. Blachier, M. Beaumont, and E. Kim, "Cysteine-derived hydrogen sulfide and gut health: a matter of endogenous or bacterial origin," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 22, no. 1, pp. 68–75, Jan. 2019, doi: 10.1097/MCO.0000000000000526.

[205] S. Sanchez, R. Rodríguez-Sanoja, A. Ramos, and A. L. Demain, "Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids," *J. Antibiot. (Tokyo).*, vol. 71, no. 1, pp. 26–36, Jan. 2018, doi: 10.1038/JA.2017.142.

[206] N. Otaru *et al.*, "GABA Production by Human Intestinal Bacteroides spp.: Prevalence, Regulation, and Role in Acid Stress Tolerance," *Front. Microbiol.*, vol. 12, Apr. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.656895.

[207] T. Perez-Berezo *et al.*, "Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41467-017-01403-9.

[208] A. Baj, E. Moro, M. Bistoletti, V. Orlandi, F. Crema, and C. Giaroni, "Molecular Sciences

Glutamatergic Signaling Along The Microbiota-Gut-Brain Axis," doi: 10.3390/ijms20061482.

[209] V. Tremaroli and F. Bäckhed, "Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism," *Nature*. 2012, doi: 10.1038/nature11552.

[210] Y. Asano *et al.*, "Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 303, no. 11, Dec. 2012, doi: 10.1152/AJPGI.00341.2012.

[211] B. P. Willing *et al.*, "An Overview on Fecal Branched Short-Chain Fatty Acids Along Human Life and as Related With Body Mass Index: Associated Dietary and Anthropometric Factors," 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00973.

[212] G. den Besten, K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D.-J. Reijngoud, and B. M. Bakker, "The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism," *J. Lipid Res.*, vol. 54, no. 9, p. 2325, Sep. 2013, doi: 10.1194/JLR.R036012.

[213] Y. P. Silva, A. Bernardi, and R. L. Frozza, "The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication," *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, vol. 11, Jan. 2020, doi: 10.3389/FENDO.2020.00025/FULL.

[214] A. Mayorgas, I. Dotti, and A. Salas, "Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function," *Molecular Nutrition and Food Research*. 2021, doi: 10.1002/mnfr.202000188.

[215] JH. Cumming *et al.*, "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood," *Gut*, vol. 28, no. 10, pp. 1221–1227, 1987, doi: 10.1136/GUT.28.10.1221.

[216] J. Park *et al.*, "Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway," *Mucosal Immunol. 2015 81*, vol. 8, no. 1, pp. 80–93, Jun. 2014, doi: 10.1038/mi.2014.44.

[217] K. M. Maslowski *et al.*, "Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43," *Nat. 2009 4617268*, vol. 461, no. 7268, pp. 1282–1286, Oct. 2009, doi: 10.1038/nature08530.

[218] E. Hosseini, C. Grootaert, W. Verstraete, and T. Van De Wiele, "Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut," 2011, doi: 10.1111/j.1753-

4887.2011.00388.x.

[219] M. Vinolo *et al.,* "Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 22, no. 9, pp. 849–855, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2010.07.009.

[220] C. Jobin and R. Sartor, "The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosalinflammation and protection," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 278, no. 3, 2000, doi: 10.1152/AJPCELL.2000.278.3.C451.

[221] N. Singh *et al.*, "Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis," *Immunity*, vol. 40, no. 1, pp. 128–139, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.12.007.

[222] E. Gaudier *et al.*, "Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 287, no. 6, Dec. 2004, doi: 10.1152/AJPGI.00219.2004.

[223] H. Hatayama *et al.*, "The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 356, no. 3, pp. 599–603, May 2007, doi: 10.1016/J.BBRC.2007.03.025.

[224] IA. Finnie *et al.*, "Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate," *Gut*, vol. 36, no. 1, pp. 93–99, 1995, doi: 10.1136/GUT.36.1.93.

[225] S. Deleu *et al.*, "Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD?," *EBioMedicine*, vol. 66, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.EBIOM.2021.103293.

[226] SA. Vanhoutvin *et al.*, "The effects of butyrate enemas on visceral perception in healthy volunteers," *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 21, no. 9, Sep. 2009, doi: 10.1111/J.1365-2982.2009.01324.X.

[227] S. Bourdu *et al.*, "Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats," *Gastroenterology*, vol. 128, no. 7, pp. 1996–2008, 2005, doi: 10.1053/J.GASTRO.2005.03.082.

[228] P. Kannampalli, R. Shaker, and J. N. Sengupta, "Colonic Butyrate-algesic or analgesic?," doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01775.x.

[229] R. Soret *et al.*, "Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 5, 2010, doi: 10.1053/J.GASTRO.2010.01.053.

[230] S. Fukumoto *et al.*, "Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 284, no. 5, May 2003, doi: 10.1152/AJPREGU.00442.2002.

[231] N. R. Hurst, D. M. Kendig, K. S. Murthy, and J. R. Grider, "The Short Chain Fatty Acids, Butyrate and Propionate, have Differential Effects on the Motility of the Guinea Pig Colon," *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 26, no. 11, p. 1586, Nov. 2014, doi: 10.1111/NMO.12425.

[232] S. Abrahamse *et al.,* "Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells," *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 4, pp. 629–634, 1999, doi: 10.1093/CARCIN/20.4.629.

[233] X. Wu, Y. Wu, L. He, L. Wu, X. Wang, and Z. Liu, "Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer," *J. Cancer*, vol. 9, no. 14, pp. 2510–2517, 2018, doi: 10.7150/jca.25324.

[234] D. V Guzior and R. A. Quinn, "Review: microbial transformations of human bile acids," doi: 10.1186/s40168-021-01101-1.

[235] J. A. Winston and C. M. Theriot, "Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota," *Gut Microbes*, vol. 11, 2020, doi: 10.1080/19490976.2019.1674124.

[236] K. Zhan *et al.*, "Gut Microbiota-Bile Acid Crosstalk in Diarrhea-Irritable Bowel Syndrome," 2020, doi: 10.1155/2020/3828249.

[237] J. A. Winston and C. M. Theriot, "Gut Microbes Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota," 2019, doi: 10.1080/19490976.2019.1674124.

[238] R. Sun, C. Xu, B. Feng, X. Gao, and Z. Liu, "Critical roles of bile acids in regulating intestinal mucosal immune responses," *Therap. Adv. Gastroenterol.*, vol. 14, 2021, doi: 10.1177/17562848211018098.

[239] W. Li *et al.*, "A bacterial bile acid metabolite modulates Treg activity through the nuclear

hormone receptor NR4A1," *Cell Host Microbe*, vol. 0, no. 0, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.CHOM.2021.07.013.

[240] Y. Yu *et al.*, "Deoxycholic acid activates colonic afferent nerves via 5-HT 3 receptor-dependent and-independent mechanisms," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 317, pp. 275–284, 2019, doi: 10.1152/ajpgi.00016.2019.-Increased.

[241] F. Alemi *et al.*, "The TGR5 receptor mediates bile acid–induced itch and analgesia," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 4, pp. 1513–1530, Apr. 2013, doi: 10.1172/JCI64551.

[242] R. J. Traub, B. Tang, Y. Ji, S. Pandya, H. Yfantis, and Y. Sun, "A Rat Model of Chronic Postinflammatory Visceral Pain Induced by Deoxycholic Acid," *Gastroenterology*, vol. 135, no. 6, pp. 2075–2083, Dec. 2008, doi: 10.1053/J.GASTRO.2008.08.051.

[243] N. M. Sagar *et al.*, "The pathophysiology of bile acid diarrhoea: differences in the colonic microbiome, metabolome and bile acids," 2020, doi: 10.1038/s41598-020-77374-7.

[244] L. Gorissen *et al.*, "Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by Bifidobacterium species," *Appl. Microb. CELL Physiol.*, doi: 10.1007/s00253-010-2713-1.

[245] T. Magrone, N. Kamada, A. Finamore, J. Kunisawa, A. Saika, and T. Nagatake, "Host- and Microbe-Dependent Dietary Lipid Metabolism in the Control of Allergy, Inflammation, and Immunity," *Front. Nutr. | www.frontiersin.org*, vol. 1, p. 36, 2019, doi: 10.3389/fnut.2019.00036.

[246] J. Miyamoto *et al.*, "A Gut Microbial Metabolite of Linoleic Acid, 10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic Acid, Ameliorates Intestinal Epithelial Barrier Impairment Partially via GPR40-MEK-ERK Pathway *," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, pp. 2902–2918, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.610733.

[247] J. Miyamoto *et al.*, "Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids," *Nat. Commun. 2019 101*, vol. 10, no. 1, pp. 1–15, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11978-0.

[248] T. Goto *et al.*, "10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, potently activates PPARγ and stimulates adipogenesis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 459, no. 4, pp. 597–603, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.BBRC.2015.02.154.

[249] C. Druart *et al.*, “Ability of the gut microbiota to produce PUFA-derived bacterial metabolites: proof of concept in germ-free versus conventionalized mice,” 2015, doi: 10.1002/mnfr.201500014.

[250] A. Steimle, I. B. Autenrieth, and J. S. Frick, “Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens,” *International Journal of Medical Microbiology*. 2016, doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.001.

[251] F. Di Lorenzo, C. De Castro, A. Silipo, and A. Molinaro, “Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions,” *FEMS Microbiology Reviews*. 2019, doi: 10.1093/femsre/fuz002.

[252] C. E. Chandler and R. K. Ernst, “Open Peer Review Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response [version 1; referees: 2 approved],” p. 1334, 2017, doi: 10.12688/f1000research.11388.1.

[253] K. Miyake, “Invited review: Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors,” *J. Endotoxin Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 195–204, Aug. 2006, doi: 10.1179/096805106X118807.

[254] P. M. Chilton, C. A. Embry, and T. C. Mitchell, “Effects of differences in lipid A structure on TLR4 pro-inflammatory signaling and inflammasome activation,” *Front. Immunol.*, vol. 3, no. JUN, 2012, doi: 10.3389/FIMMU.2012.00154.

[255] A. Poltorak, P. Ricciardi-Castagnoli, S. Citterio, and B. Beutler, “Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 5, pp. 2163–2167, Feb. 2000, doi: 10.1073/PNAS.040565397.

[256] S. K. Maitra,’, R. Nachum, and F. C. Pearson3, “Establishment of Beta-Hydroxy Fatty Acids as Chemical Marker Molecules for Bacterial Endotoxin by Gas Chromatography-Mass Spectrometry,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 52, no. 3, pp. 510–514, 1986, Accessed: Aug. 20, 2021. [Online]. Available: https://journals.asm.org/journal/aem.

[257] Y. Cao and X. Zhang, “Production of long-chain hydroxy fatty acids by microbial conversion,” doi: 10.1007/s00253-013-4815-z.

[258] L. Hammerer *et al.*, “Controlling the Regioselectivity of Fatty Acid Hydroxylation (C10) at α- and

β-Position by CYP152A1 (P450Bsβ) Variants," *ChemCatChem*, vol. 11, no. 22, pp. 5642–5649, Nov. 2019, doi: 10.1002/CCTC.201901679.

[259] K. Kyoung-Rok and D-K. Oh, "Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1473–1485, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2013.07.004.

[260] D.-S. Lee *et al.*, "Substrate Recognition and Molecular Mechanism of Fatty Acid Hydroxylation by Cytochrome P450 from Bacillus subtilis: CRYSTALLOGRAPHIC, SPECTROSCOPIC, AND MUTATIONAL STUDIES *," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 11, pp. 9761–9767, Mar. 2003, doi: 10.1074/JBC.M211575200.

[261] K. S. Rabe, M. Erkelenz, K. Kiko, and C. M. Niemeyer, "Peroxidase activity of bacterial cytochrome P450 enzymes: Modulation by fatty acids and organic solvents," *Biotechnol. J.*, vol. 5, no. 8, 2010, doi: 10.1002/biot.201000028ï.

[262] L. J. Cohen *et al.*, "Functional metagenomic discovery of bacterial effectors in the human microbiome and isolation of commendamide, a GPCR G2A/132 agonist," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, doi: 10.1073/pnas.1508737112.

[263] A. Lynch *et al.*, "The Bacteroidales produce an N-acylated derivative of glycine with both cholesterol-solubilising and hemolytic activity OPEN," doi: 10.1038/s41598-017-13774-6.

[264] L. J. Cohen *et al.*, "Commensal bacteria produce GPCR ligands that mimic human signaling molecules HHS Public Access," *Nature*, vol. 549, no. 7670, pp. 48–53, 2017, doi: 10.1038/nature23874.

[265] R. Marion-Letellier, G. Savoye, and S. Ghosh, "Critical Review Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammation," doi: 10.1002/iub.1428.

[266] M. Pesce, O. Borrelli, S. Gigli, L. Seguella, R. Cuomo, and G. Esposito, "Endocannabinoid-related compounds in gastrointestinal diseases," doi: 10.1111/jcmm.13359.

[267] F.-Y. Chang *et al.*, "Gut-inhabiting Clostridia build human GPCR ligands by conjugating neurotransmitters with diet- and human-derived fatty acids," *Nat. Microbiol.*, doi: 10.1038/s41564-021-00887-y.

[268] X. Bian *et al.*, "In vivo evidence for a prodrug activation mechanism during colibactin

maturation," *Chembiochem*, vol. 14, no. 10, pp. 1194–1197, Jul. 2013, doi: 10.1002/CBIC.201300208.

[269] M. I. Vizcaino, P. Engel, E. Trautman, and J. M. Crawford, "Comparative Metabolomics and Structural Characterizations Illuminate Colibactin Pathway-Dependent Small Molecules," 2014, doi: 10.1021/ja503450q.

[270] C. Bortherton *et al.*, "Isolation of a metabolite from the pks island provides insights into colibactin biosynthesis and activity," *Org. Lett.*, vol. 17, no. 6, pp. 1545–1548, Mar. 2015, doi: 10.1021/ACS.ORGLETT.5B00432.

[271] R. Yang *et al.*, "Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by Bacillus," *Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020 10419*, vol. 104, no. 19, pp. 8077–8087, Aug. 2020, doi: 10.1007/S00253-020-10801-X.

[272] I. W. Hamley, "Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity," *Chem. Commun*, vol. 51, p. 8574, 2015, doi: 10.1039/c5cc01535a.

[273] T. Faïs *et al.*, "Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin," *Toxins (Basel).*, vol. 10, no. 4, Apr. 2018, doi: 10.3390/TOXINS10040151.

[274] S. G. B. Gowda *et al.*, "Identification of short-chain fatty acid esters of hydroxy fatty acids (SFAHFAs) in a murine model by nontargeted analysis using ultra-high-performance liquid chromatography/linear ion trap quadrupole-Orbitrap mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, doi: 10.1002/rcm.8831.

[275] I. Miller, "The gut-brain axis: historical reflections," 2018, doi: 10.1080/16512235.2018.1542921.

[276] T. F. Bastiaanssen and J. F. Cryan, "The Microbiota-Gut-Brain Axis in Mental Health and Medication Response: Parsing Directionality and Causality," doi: 10.1093/ijnp/pyaa088.

[277] J. F. Cryan *et al.*, "The microbiota-gut-brain axis," *Physiol. Rev.*, 2019, doi: 10.1152/physrev.00018.2018.

[278] E. A. Mayer, K. Tillisch, and A. Gupta, "Gut/brain axis and the microbiota," *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 3, p. 926, Mar. 2015, doi: 10.1172/JCI76304.

[279] P. Luczynski *et al.*, "Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior," *Int. J.*

Neuropsychopharmacol., vol. 19, no. 8, pp. 1–17, 2016, doi: 10.1093/ijnp/pyw020.

[280] G. De Palma, S. M. Collins, P. Bercik, and E. F. Verdu, "The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: Stressed bugs, stressed brain or both?," *J. Physiol.*, vol. 592, no. 14, pp. 2989–2997, Jul. 2014, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2014.273995.

[281] S. M. Collins, M. Surette, and P. Bercik, "The interplay between the intestinal microbiota and the brain," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 11, pp. 735–742, Nov. 2012, doi: 10.1038/NRMICRO2876.

[282] S. M. Collins, Z. Kassam, and P. Bercik, "The adoptive transfer of behavioral phenotype via the intestinal microbiota: Experimental evidence and clinical implications," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 240–245, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.MIB.2013.06.004.

[283] E. A. Mayer, "Gut feelings: The emerging biology of gut-"brain communication," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 8, pp. 453–466, Aug. 2011, doi: 10.1038/NRN3071.

[284] N. Li *et al.*, "Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis," *Stress*, vol. 22, no. 5, pp. 592–602, 2019, doi: 10.1080/10253890.2019.1617267.

[285] T. Bear, J. Dalziel, J. Coad, N. Roy, C. Butts, and P. Gopal, "The Microbiome-Gut-Brain Axis and Resilience to Developing Anxiety or Depression under Stress," *Microorg. 2021, Vol. 9, Page 723*, vol. 9, no. 4, p. 723, Mar. 2021, doi: 10.3390/MICROORGANISMS9040723.

[286] M. Gareau, M. Silva, and M. Perdue, "Pathophysiological Mechanisms of Stress-Induced Intestina Damage," *Curr. Mol. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 274–281, Jun. 2008, doi: 10.2174/156652408784533760.

[287] F. JA, R. L, and C. JF, "Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome," *Neurobiol. Stress*, vol. 7, pp. 124–136, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.YNSTR.2017.03.001.

[288] R. D. Moloney, L. Desbonnet, G. Clarke, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, "The microbiome: stress, health and disease," doi: 10.1007/s00335-013-9488-5.

[289] K. G. Margolis, J. F. Cryan, and E. A. Mayer, "The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood," *Gastroenterology*, vol. 160, no. 5, pp. 1486–1501, Apr. 2021, doi:

10.1053/J.GASTRO.2020.10.066.

[290] O. Rom and A. Z. Reznick, “The Stress Reaction: A Historical Perspective,” *Advs Exp. Med. Biol. Respir.*, vol. 20, pp. 1–4, 2016, doi: 10.1007/5584_2015_195.

[291] M. BL, “Feeding Systems and the Gut Microbiome: Gut-Brain Interactions With Relevance to Psychiatric Conditions,” *Psychosomatics*, vol. 58, no. 6, pp. 574–580, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.PSYM.2017.06.002.

[292] A. Mariotti, “The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain–body communication,” *Futur. Sci. OA*, vol. 1, no. 3, Nov. 2015, doi: 10.4155/FSO.15.21.

[293] N. Schneiderman, G. Ironson, and S. D. Siegel, “STRESS AND HEALTH: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants,” doi: 10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141.

[294] J. P. Karl *et al.*, “Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. SEP, Sep. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.02013.

[295] H. L and Z. BS, “Stress gets into the belly: Early life stress and the gut microbiome,” *Behav. Brain Res.*, vol. 414, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.BBR.2021.113474.

[296] A. Icenhour, F. Labrenz, T. Roderigo, S. Benson, and S. Elsenbruch, “The Role of Chronic Stress in Normal Visceroception: Insights From an Experimental Visceral Pain Study in Healthy Volunteers,” *Front. Psychiatry*, vol. 11, Mar. 2020, doi: 10.3389/FPSYT.2020.00107/FULL.

[297] N. P. Hyland *et al.*, “A distinct subset of submucosal mast cells undergoes hyperplasia following neonatal maternal separation: a role in visceral hypersensitivity?,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 100, pp. 1134–1177, 2008, doi: 10.1136/gut.2008.167882.

[298] A. R. Mackos, V. A. Varaljay, R. Maltz, T. L. Gur, and M. T. Bailey, “Role of the Intestinal Microbiota in Host Responses to Stressor Exposure,” *Int. Rev. Neurobiol.*, vol. 131, pp. 1–19, Jan. 2016, doi: 10.1016/BS.IRN.2016.08.002.

[299] M. Oyola and R. Handa, “Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity,” *Stress*, vol. 20, no. 5, pp. 476–494, Sep. 2017, doi: 10.1080/10253890.2017.1369523.

[300] I. Bernatova *et al.*, « Chronic Stress Produces Persistent Increases in Plasma Corticosterone,

Reductions in Brain and Cardiac Nitric Oxide Production, and Delayed Alterations in Endothelial Function in Young Prehypertensive Rats », *Front. Physiol.*, vol. 9, p. 1179, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01179

[301] J. A. Sheng *et al.*, "The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions," *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 14, Jan. 2021, doi: 10.3389/FNBEH.2020.601939.

[302] B. K. Rodiño-Janeiro, C. Alonso-Cotoner, M. Pigrau, B. Lobo, M. Vicario, and J. Santos, "Role of Corticotropin-releasing Factor in Gastrointestinal Permeability," *J. Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 21, no. 1, p. 33, 2015, doi: 10.5056/JNM14084.

[303] M. Million and M. Larauche, "Stress, Sex and the Enteric Nervous System," doi: 10.1111/nmo.12937.

[304] E. K. Adam, M. E. Quinn, R. Tavernier, M. T. McQuillan, K. A. Dahlke, and K. E. Gilbert, "Diurnal Cortisol Slopes and Mental and Physical Health Outcomes:A Systematic Review and Meta-analysis," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 83, p. 25, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2017.05.018.

[305] M. A. Howland, C. A. Sandman, and L. M. Glynn, "Developmental origins of the human hypothalamic-pituitary-adrenal axis," *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, vol. 12, no. 5, p. 321, Sep. 2017, doi: 10.1080/17446651.2017.1356222.

[306] M. Weinstock, "The long-term behavioural consequences of prenatal stress," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 32, no. 6, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.002.

[307] V. G. Moisiadis and S. G. Matthews, "Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 10, no. 7, pp. 391–402, 2014, doi: 10.1038/NRENDO.2014.73.

[308] T. Surdea-Blaga, "Psychosocial determinants of irritable bowel syndrome," *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, no. 7, 2012, doi: 10.3748/wjg.v18.i7.616.

[309] L. Knaepen, J. L. Pawluski, J. Patijn, M. van Kleef, D. Tibboel, and E. A. Joosten, "Perinatal maternal stress and serotonin signaling: Effects on pain sensitivity in offspring," *Dev. Psychobiol.*, vol. 56, no. 5, pp. 885–896, Jul. 2014, doi: 10.1002/DEV.21184.

[310] KD. Harris and A. Thiele, “Cortical state and attention,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 9, pp. 509–523, Sep. 2011, doi: 10.1038/NRN3084.

[311] M. van Bodegom, J. R. Homberg, and M. J. A. G. Henckens, “Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, Apr. 2017, doi: 10.3389/FNCEL.2017.00087.

[312] A. Kapoor, E. Dunn, A. Kostaki, M. H. Andrews, S. G. Matthews, and S. G. Matthews, “Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids,” *J Physiol*, vol. 572, no. 1, pp. 31–44, 2006, doi: 10.1113/jphysiol.2006.105254.

[313] S. M. O’mahony, N. P. Hyland, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, “Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction,” doi: 10.1007/s00213-010-2010-9.

[314] F. Barreau, L. Ferrier, J. Fioramonti, and L. Bueno, “New Insights in the Etiology and Pathophysiology of Irritable Bowel Syndrome: Contribution of Neonatal Stress Models,” 2007.

[315] C. S. Pohl, J. E. Medland, A. J. Moeser, and A. J. Moeser, “Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 309, pp. 927–941, 2015, doi: 10.1152/ajpgi.00206.2015.-Early-life.

[316] E. Won and Y.-K. Kim, “Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Stress, the Autonomic Nervous System, and the Immune-kynurenine Pathway in the Etiology of Depression,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 14, pp. 665–673, 2016, doi: 10.2174/1570159X14666151208113.

[317] L. Boyanova *et al.*, “Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria,” *Anaerobe*, vol. 44, pp. 13–19, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.ANAEROBE.2017.01.003.

[318] A. Accarie and T. Vanuytsel, “Animal Models for Functional Gastrointestinal Disorders,” *Front. Psychiatry*, vol. 11, Nov. 2020, doi: 10.3389/FPSYT.2020.509681.

[319] M. Pigrau *et al.*, “The joint power of sex and stress to modulate brain–gut–microbiota axis and intestinal barrier homeostasis: implications for irritable bowel syndrome,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 28, no. 4, pp. 463–486, Apr. 2016, doi: 10.1111/NMO.12717.

[320] F. Guzmán-Mejía, M. Godínez-Victoria, A. Vega-Bautista, J. Pacheco-Yépez, and M. E. Drago-Serrano, “Intestinal homeostasis under stress siege,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 10, May 2021, doi: 10.3390/IJMS22105095.

[321] Y. Taché and M. Million, “Role of Corticotropin-releasing Factor Signaling in Stress-related Alterations of Colonic Motility and Hyperalgesia,” *J. Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 21, no. 1, p. 8, 2015, doi: 10.5056/JNM14162.

[322] G. De Palma *et al.*, “ARTICLE Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice,” *Nat. Commun.*, 2015, doi: 10.1038/ncomms8735.

[323] N. Sudo*et al.*, “Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice,” *J. Physiol.*, vol. 558, no. Pt 1, pp. 263–275, Jul. 2004, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2004.063388.

[324] K. Bradford *et al.*, “Association Between Early Adverse Life Events and Irritable Bowel Syndrome,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 4, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.cgh.2011.12.018.

[325] B. E. Leonard, “The HPA and immune axes in stress: The involvement of the serotonergic system,” *Eur. Psychiatry*, vol. 20, no. SUPPL. 3, 2005, doi: 10.1016/S0924-9338(05)80180-4.

[326] G. J. Boersma *et al.*, “Long-Term Impact of Early Life Events on Physiology and Behaviour,” *J. Neuroendocrinol.*, vol. 26, pp. 587–602, 2014, doi: 10.1111/jne.12153.

[327] S. Maccari, V. Piazza, M. Kabbaj, A. Barbazanges, H. Simon, and M. Le Moal, “Adoption Reverses the Long-Term Impairment in Glucocorticoid Feedback Induced by Prenatal Stress,” *J. Neurosci.*, vol. 75, pp. 11–12, 1995.

[328] S. Maccari and S. Morley-Fletcher, “Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 32, no. SUPPL 1, pp. S10–S15, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2007.06.005.

[329] M. G. Gareau, J. Jury, G. Macqueen, and P. M. Sherman, “Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation,” doi: 10.1136/gut.2006.117176.

[330] F. Barreau, L. Ferrier, and J. Fioramonti, “Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats,” *Gut*, vol. 53, pp. 501–506, 2004, doi: 10.1136/gut.2003.024174.

[331] R. D. Moloney, O. F. O’leary, D. Felice, B. Bettler, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, “Early-life stress induces visceral hypersensitivity in mice,” *Neurosci. Lett.*, vol. 512, pp. 99–102, 2012, doi: 10.1016/j.neulet.2012.01.066.

[332] S. H. Rhee, C. Pothoulakis, and E. A. Mayer, “Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis,” 2009, doi: 10.1038/nrgastro.2009.35.

[333] O'Malley *et al.*, “Alterations in colonic corticotropin-releasing factor receptors in the maternally separated rat model of irritable bowel syndrome: differential effects of acute psychological and physical stressors,” *Peptides*, vol. 31, no. 4, pp. 662–670, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.PEPTIDES.2010.01.004.

[334] AK. Varghese *et al.*, “Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression,” *Gastroenterology*, vol. 130, no. 6, pp. 1743–1753, 2006, doi: 10.1053/J.GASTRO.2006.02.007.

[335] AH. Veenema, “Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice,” *Endocrinology*, vol. 149, no. 6, pp. 2727–2736, Jun. 2008, doi: 10.1210/EN.2007-1469.

[336] H. Helgeland, L. Sandvik, K. S. Mathiesen, and H. Kristensen, “Childhood predictors of recurrent abdominal pain in adolescence: A 13-year population-based prospective study,” *J. Psychosom. Res.*, vol. 68, no. 4, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.jpsychores.2009.10.010.

[337] T. L. Gur, B. L. Worly, and M. T. Bailey, “Stress and the commensal microbiota: Importance in parturition and infant neurodevelopment,” *Front. Psychiatry*, vol. 6, no. FEB, 2015, doi: 10.3389/FPSYT.2015.00005.

[338] E. P. Davis, L. M. Glynn, F. Waffarn, and C. A. Sandman, “Prenatal maternal stress programs infant stress regulation,” doi: 10.1111/j.1469-7610.2010.02314.x.

[339] C. De Weerth and J. K. Buitelaar, “Physiological stress reactivity in human pregnancy - A review,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 29, no. 2, pp. 295–312, 2005, doi:

10.1016/J.NEUBIOREV.2004.10.005.

[340] PJ. Brunton, “Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring,” *Reproduction*, vol. 146, no. 5, Nov. 2013, doi: 10.1530/REP-13-0258.

[341] A. Ronald *et al.* “Prenatal Maternal Stress Associated with ADHD and Autistic Traits in early Childhood,” *Front. Psychol.*, vol. 1, no. JAN, 2011, doi: 10.3389/FPSYG.2010.00223.

[342] MAC. Zijlamans *et al.*, “Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 53, pp. 233–245, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2015.01.006.

[343] AV. Golubeva *et al.*, “Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 60, pp. 58–74, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2015.06.002.

[344] H.-J. Wang *et al.*, “Prenatal maternal stress induces visceral hypersensitivity of adult rat offspring through activation of cystathionine-β-synthase signaling in primary sensory neurons,” *Mol. Pain*, vol. 14, May 2018, doi: 10.1177/1744806918777406.

[345] E. Jašarević *et al.*, “The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus,” *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41593-018-0182-5.

[346] CL. Howerton and TL. Bale, “Prenatal programing: at the intersection of maternal stress and immune activation,” *Horm. Behav.*, vol. 62, no. 3, pp. 237–242, Aug. 2012, doi: 10.1016/J.YHBEH.2012.03.007.

[347] R. Beijers, J. Jansen, M. Riksen-Walraven, and C. De Weerth, “Maternal prenatal anxiety and stress predict infant illnesses and health complaints,” *Pediatrics*, vol. 126, no. 2, Aug. 2010, doi: 10.1542/PEDS.2009-3226.

[348] D. B. Davalos, C. A. Yadon, and H. C. Tregellas, “Untreated prenatal maternal depression and the potential risks to offspring: a review,” doi: 10.1007/s00737-011-0251-1.

[349] B. Romero-Gonzalez, R. A. Caparros-Gonzalez, R. Gonzalez-Perez, P. Delgado-Puertas, and M. I. Peralta-Ramirez, “Newborn infants’ hair cortisol levels reflect chronic maternal stress during pregnancy,” *PLoS One*, vol. 13, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0200279.

[350] AK. Aatsinki *et al.*, “Maternal prenatal psychological distress and hair cortisol levels associate with infant fecal microbiota composition at 2.5 months of age,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 119, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2020.104754.

[351] B. R. Mueller and T. L. Bale, “Behavioral/Systems/Cognitive Sex-Specific Programming of Offspring Emotionality after Stress Early in Pregnancy,” 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1424-08.2008.

[352] E. Merlot, D. Couret, and W. Otten, “Prenatal stress, fetal imprinting and immunity,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 22, no. 1, pp. 42–51, Jan. 2008, doi: 10.1016/J.BBI.2007.05.007.

[353] E. Sullivan, K. Hinde, S. P. Mendoza, and J. P. Capitanio, “Cortisol Concentrations in the Milk of Rhesus Monkey Mothers are Associated with Confident Temperament in Sons, but not Daughters,” *Dev. Psychobiol.*, vol. 53, no. 1, p. 96, Jan. 2011, doi: 10.1002/DEV.20483.

[354] E. Jašarević, C. D. Howard, A. M. Misic, D. P. Beiting, and T. L. Bale, “Stress during pregnancy alters temporal and spatial dynamics of the maternal and offspring microbiome in a sex-specific manner OPEN,” 2017, doi: 10.1038/srep44182.

[355] D. Rojo *et al.*, “Ranking the impact of human health disorders on gut metabolism: Systemic lupus erythematosus and obesity as study cases,” doi: 10.1038/srep08310.

[356] M. Olier *et al.*, “Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity,” *Gut Microbes*, vol. 3, no. 6, pp. 501–509, Nov. 2012, doi: 10.4161/GMIC.21737.

[357] EL. Souza *et al.*, “Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 65, no. 3, pp. 201–210, Mar. 2016, doi: 10.1099/JMM.0.000222.

[358] PD. Cani *et al.*, “Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability,” *Gut*, vol. 58, no. 8, pp. 1091–1103, Aug. 2009, doi: 10.1136/GUT.2008.165886.

[359] M. Rastelli, P. D. Cani, and C. Knauf, “The Gut Microbiome Influences Host Endocrine Functions,” *Endocr. Rev.*, vol. 40, no. 5, pp. 1271–1284, Oct. 2019, doi: 10.1210/ER.2018-

00280.

[360] J. Winckler and R. Symonds, “Fructo-oligosaccharide reduces inflammation in a dextran sodium sulphate mouse model of colitis,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 52, no. 1, pp. 52–58, Jan. 2007, doi: 10.1007/S10620-006-9224-Z.

[361] W. Kruis *et al.*, “Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine,” *Gut*, vol. 53, no. 11, pp. 1617–1623, Nov. 2004, doi: 10.1136/GUT.2003.037747.

[362] M. Floch *et al.*, “Recommendations for probiotic use-2011 update,” *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 45 Suppl, no. SUPPL. 3, Nov. 2011, doi: 10.1097/MCG.0B013E318230928B.

[363] J. Choo *et al.*, “A Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)γ Agonist 2-Hydroxyethyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate Exerts Anti-Inflammatory Effects in Colitis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 42, pp. 25609–25619, Oct. 2015, doi: 10.1074/JBC.M115.673046.

[364] G. Harmon *et al.*, “Pharmacological correction of a defect in PPAR-gamma signaling ameliorates disease severity in Cftr-deficient mice,” *Nat. Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 313–318, Mar. 2010, doi: 10.1038/NM.2101.

[365] K. Duszka *et al.*, “Intestinal PPARγ signalling is required for sympathetic nervous system activation in response to caloric restriction,” *Sci. Rep.*, vol. 6, Nov. 2016, doi: 10.1038/SREP36937.

[366] C. Williams, R. Panaccione, S. Ghosh, and K. Rioux, “Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease,” *Therap. Adv. Gastroenterol.*, vol. 4, no. 4, p. 237, 2011, doi: 10.1177/1756283X11405250.

[367] BJ. Rembacken, “Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial,” *Lancet (London, England)*, vol. 354, no. 9179, pp. 635–639, Aug. 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(98)06343-0.

[368] E. Furrie *et al.*, “Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial,” *Gut*, vol. 54, no. 2, pp. 242–249, Feb. 2005, doi: 10.1136/GUT.2004.044834.

[369] P. Marteau, “Probiotics, prebiotics, synbiotics: ecological treatment for inflammatory bowel

disease?," *Gut*, vol. 55, no. 12, p. 1692, Dec. 2006, doi: 10.1136/GUT.2004.051458.

[370] K. Bradford *et al.*, "Association Between Early Adverse Life Events and Irritable Bowel Syndrome," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, doi: 10.1016/j.cgh.2011.12.018.

[371] K. N. Haas and J. L. Blanchard, "Reclassification of the Clostridium clostridioforme and Clostridium sphenoides clades as Enterocloster gen. nov. and Lacrimispora gen. nov., including reclassification of 15 taxa," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 70, no. 1, pp. 23–34, Nov. 2019, doi: 10.1099/IJSEM.0.003698.

[372] F. SM *et al.*, "Clostridium clostridioforme: a mixture of three clinically important species," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 5, pp. 319–324, May 2005, doi: 10.1007/S10096-005-1334-6.

[373] Y. Song, C. Liu, and S. M. Finegold, "Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 11, pp. 6459–6465, Nov. 2004, doi: 10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004.

[374] SM. Finegold *et al.*, "Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 35, no. Suppl 1, pp. S6–S16, 2002, doi: 10.1086/341914.

[375] DK. Kinney *et al.*, "Prenatal stress and risk for autism," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 32, no. 8, pp. 1519–1532, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.NEUBIOREV.2008.06.004.

[376] M. Weinstock *et al.*, "Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior," *Neurobiol. Stress*, vol. 6, pp. 3–13, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.YNSTR.2016.08.004.

[377] DQ. Beversdorf *et al.*, "Prenatal Stress and Maternal Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorders: Potential Points for Intervention," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 25, no. 41, pp. 4331–4343, Nov. 2019, doi: 10.2174/1381612825666191119093335.

[378] R. Dakhal *et al.*, "Production of gaba (γ - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review," *Braz. J. Microbiol.*, vol. 43, no. 4, pp. 1230–1241, Oct. 2012, doi: 10.1590/S1517-83822012000400001.

[379] J. H. Seok, K. B. Park, Y. H. Kim, M. O. Bae, M. K. Lee, and S. H. Oh, "Production and characterization of Kimchi with enhanced levels of γ-aminobutyric acid," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 17, no. 5, 2008.

[380] D. Ma *et al.*, "Structure and mechanism of a glutamate–GABA antiporter," *Nat. 2012 4837391*, vol. 483, no. 7391, pp. 632–636, Mar. 2012, doi: 10.1038/nature10917.

[381] X. B. Lin *et al.*, "The evolution of ecological facilitation within mixed-species biofilms in the mouse gastrointestinal tract," *ISME J. 2018 1211*, vol. 12, no. 11, pp. 2770–2784, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41396-018-0211-0.

[382] Y. Cui, K. Miao, S. Niyaphorn, and X. Qu, "Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria: A Systematic Review," *Int. J. Mol. Sci. 2020, Vol. 21, Page 995*, vol. 21, no. 3, p. 995, Feb. 2020, doi: 10.3390/IJMS21030995.

[383] P. Enck *et al.*, "Irritable bowel syndrome," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.14.

[384] I. M. Gralnek, R. D. Hays, A. A. Kilbourne, B. Naliboff, and E. A. Mayer, "The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 3, pp. 654–660, Sep. 2000, doi: 10.1053/GAST.2000.16484.

[385] M. Simren *et al.*, and T. J, "Cumulative Effects of Psychologic Distress, Visceral Hypersensitivity, and Abnormal Transit on Patient-reported Outcomes in Irritable Bowel Syndrome," *Gastroenterology*, vol. 157, no. 2, pp. 391-402.e2, Aug. 2019, doi: 10.1053/J.GASTRO.2019.04.019.

[386] S. M. Collins, "A role for the gut microbiota in IBS," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014 118*, vol. 11, no. 8, pp. 497–505, Apr. 2014, doi: 10.1038/nrgastro.2014.40.

[387] L. Wilmes, J. M. Collins, K. J. O'Riordan, S. M. O'Mahony, J. F. Cryan, and G. Clarke, "Of bowels, brain and behavior: A role for the gut microbiota in psychiatric comorbidities in irritable bowel syndrome," *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 33, no. 3, Mar. 2021, doi: 10.1111/nmo.14095.

[388] E. B. Blanchard *et al.*, "The role of stress in symptom exacerbation among IBS patients," *J. Psychosom. Res.*, vol. 64, no. 2, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.jpsychores.2007.10.010.

[389] L. Chang, "The Role of Stress on Physiologic Responses and Clinical Symptoms in Irritable Bowel Syndrome," *Gastroenterology*, vol. 140, no. 3, Mar. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.032.

[390] H. Yaribeygi, Y. Panahi, H. Sahraei, T. P. Johnston, and A. Sahebkar, "The impact of stress on body function: A review," *EXCLI J.*, vol. 16, pp. 1057–1072, Jul. 2017, doi: 10.17179/EXCLI2017-

480.

[391] R. A. Caparros-Gonzalez, A. de la Torre-Luque, B. Romero-Gonzalez, J. M. Quesada-Soto, F. Alderdice, and M. I. Peralta-Ramírez, “Stress During Pregnancy and the Development of Diseases in the offspring: A Systematic-Review and Meta-Analysis,” *Midwifery*, vol. 97, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.midw.2021.102939.

[392] O. Olén, O. Stephansson, A. S. Backman, H. Törnblom, M. Simrén, and M. Altman, “Pre- and perinatal stress and irritable bowel syndrome in young adults – A nationwide register-based cohort study,” *Neurogastroenterol. Motil.*, 2018, doi: 10.1111/nmo.13436.

[393] E. X. S. Low, M. N. K. Al Mandhari, C. C. Herndon, E. X. L. Loo, E. H. Tham, and K. T. H. Siah, “Parental, perinatal, and childhood risk factors for development of irritable bowel syndrome: A systematic review,” *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2020, doi: 10.5056/jnm20109.

[394] J. Boué *et al.*, “Endogenous Regulation of Visceral Pain via Production of Opioids by Colitogenic CD4+ T Cells in Mice,” *Gastroenterology*, vol. 146, no. 1, Jan. 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.020.

[395] P. Le faouder *et al.*, “LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites,” *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 932, pp. 123–133, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2013.06.014.

[396] S. Nicolas *et al.*, “Transfer of dysbiotic gut microbiota has beneficial effects on host liver metabolism,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 13, no. 3, Mar. 2017, doi: 10.15252/msb.20167356.

[397] N. Segata *et al.*, “Metagenomic biomarker discovery and explanation,” *Genome Biol.*, vol. 12, no. 6, Jun. 2011, doi: 10.1186/GB-2011-12-6-R60.

[398] MG. Langille *et al.*, “Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, no. 9, pp. 814–821, Sep. 2013, doi: 10.1038/NBT.2676.

[399] D. A. T. Hammer, P. D. Ryan, Ø. Hammer, and D. A. T. Harper, “Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis,” *Palaeontol. Electron.*, vol. 4, no. 1, p. 178,

2001, Accessed: Oct. 13, 2021. [Online]. Available: http://palaeo-electronica.orghttp//palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

[400] F. Giacomoni *et al.*, "Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 9, May 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btu813.

[401] E. A. Thévenot, A. Roux, Y. Xu, E. Ezan, and C. Junot, "Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses," *J. Proteome Res.*, vol. 14, no. 8, Aug. 2015, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354.

[402] Y. Guitton *et al.*, "Create, run, share, publish, and reference your LC–MS, FIA–MS, GC–MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 93, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.biocel.2017.07.002.

[403] H. Ueno, "Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase," *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, vol. 10, no. 1–3. 2000, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00114-4.

[404] M.-M. Zhang *et al.*, "Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain," *Mol. Brain 2014 71*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, Jun. 2014, doi: 10.1186/1756-6606-7-47.

[405] Y. A. Saito *et al.*, "Randomised clinical trial: pregabalin vs placebo for irritable bowel syndrome," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 49, no. 4, pp. 389–397, Feb. 2019, doi: 10.1111/APT.15077.

[406] M. Gros, B. Gros, J. E. Mesonero, and E. Latorre, "Neurotransmitter Dysfunction in Irritable Bowel Syndrome: Emerging Approaches for Management," *J. Clin. Med. 2021, Vol. 10, Page 3429*, vol. 10, no. 15, p. 3429, Jul. 2021, doi: 10.3390/JCM10153429.

[407] I. Matsunaga, A. Ueda, N. Fujiwara, T. Sumimoto, and K. Ichihara, "Characterization of the ybdT gene product of Bacillus subtilis: Novel fatty acid β-hydroxylating cytochrome P450," *Lipids*, vol. 34, no. 8, pp. 841–846, Aug. 1999, doi: 10.1007/S11745-999-0431-3.

[408] I. Matsunaga, T. Sumimoto, A. Ueda, E. Kusunose, and K. Ichihara, "Fatty acid-specific,

regiospecific, and stereospecific hydroxylation by cytochrome P450 (CYP152B1) from Sphingomonas paucimobilis: Substrate structure required for α-hydroxylation," *Lipids*, vol. 35, no. 4, pp. 365–371, Apr. 2000, doi: 10.1007/S11745-000-533-Y.

[409] M. Girhard, E. Kunigk, S. Tihovsky, V. V. Shumyantseva, and V. B. Urlacher, "Light-driven biocatalysis with cytochrome P450 peroxygenases," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 111–118, Jan. 2013, doi: 10.1002/BAB.1063.

[410] M. Chegary *et al.*, "Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1791, no. 8, pp. 806–815, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.BBALIP.2009.05.006.

[411] M. Quezada, G. Buitrón, I. Moreno-Andrade, G. Moreno, and L. M. López-Marín, "The use of fatty acid methyl esters as biomarkers to determine aerobic, facultatively aerobic and anaerobic communities in wastewater treatment systems," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 266, no. 1, pp. 75–82, Jan. 2007, doi: 10.1111/J.1574-6968.2006.00509.X.

[412] T. Itoh *et al.*, "Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 924–931, Sep. 2008, doi: 10.1038/NSMB.1474.

[413] K. Celiński *et al.*, "Activated and inactivated PPARs-γ modulate experimentally induced colitis in rats," *Med. Sci. Monit.*, vol. 17, no. 4, p. BR116, 2011, doi: 10.12659/MSM.881712.

[414] GR. Gibson *et al.*, "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.*, vol. 14, no. 8, pp. 491–502, Aug. 2017, doi: 10.1038/NRGASTRO.2017.75.

[415] C. Chen *et al.*, "The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases," *Nat. Commun. 2017 81*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00901-0.

[416] B. Huang, J. M. Fettweis, J. P. Brooks, K. K. Jefferson, and G. A. Buck, "The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome," *Clin. Lab. Med.*, vol. 34, no. 4, p. 747, 2014, doi: 10.1016/J.CLL.2014.08.006.

[417] E. Amabebe and A. DOC, "Psychosocial Stress, Cortisol Levels, and Maintenance of Vaginal

Health," *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, vol. 9, no. SEP, Sep. 2018, doi: 10.3389/FENDO.2018.00568.

[418] KM. Brawner *et al.*, "Prenatal stress increases IgA coating of offspring microbiota and exacerbates necrotizing enterocolitis-like injury in a sex-dependent manner," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 89, pp. 291–299, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.BBI.2020.07.008.

Résumé

Par sa contribution à l'ensemble des grandes fonctions de l'organisme, le microbiote intestinal possède un rôle essentiel dans la physiologie et la pathologie de son hôte. Un microbiote est caractérisé par son répertoire de gènes exprimés et, plus important encore, par les métabolites qu'il sécrète. De nombreuses études ont déterminé la composition taxonomique du microbiote, mais peu en ont caractérisé les gènes actifs, les protéines ou les métabolites, ce qui pourrait être plus pertinent. En effet, la composition taxonomique du microbiote humain varie énormément d'un individu à l'autre, tandis que sa composition génétique ou sa capacité fonctionnelle est très conservée. La capacité fonctionnelle du microbiote est redondante et capitale pour maintenir sa stabilité et sa résilience. A la notion de redondance fonctionnelle est associée l'idée que, jusqu'à un certain point, les espèces sont substituables d'un microbiote à l'autre en termes de fonctionnalité. Il est donc majeur d'identifier les métabolites du microbiote intestinal et de déterminer leur effet sur l'hôte. Les travaux présentés dans cette thèse sont focalisés sur la caractérisation de métabolites lipidiques produits par les bactéries intestinales afin d'étudier les interactions entre le microbiote intestinal et son hôte.

Pour notre premier projet, nous nous sommes intéressés à une souche d'*Escherichia coli*, *E. coli* Nissle 1917 (EcN), indiquée comme probiotique dans les phases de rémission de la rectocolite hémorragique. Nous avons quantifié une augmentation de la concentration d'un acide gras β-hydroxylé, le C18-3OH, produit par EcN par rapport à des *E. coli* commensales ou pathogènes. Nous avons donc testé les propriétés anti-inflammatoires de ce lipide dans un modèle murin de colite induit par le DSS. Le C18-3OH diminuait la sévérité de l'inflammation en se liant au récepteur nucléaire PPARγ. L'utilisation d'un prébiotique (fructo-oligosaccharide) ayant une activité anti-inflammatoire, nous a permis de démontrer qu'une autre bactérie du microbiote intestinal, *Holdemanella biformis*, était également capable de produire de grande quantité de C18-3OH.

Le microbiote joue un rôle critique dans la maturation et le développement, notamment intestinal, de son hôte. Par exemple, chez la souris, une modification du microbiote, ou dysbiose, induite par des antibiotiques lors du sevrage augmente l'intensité de l'inflammation dans un modèle de colite. Le microbiote étant extrêmement sensible à son environnement, le stress, qu'il soit subit en prénatal, post natal ou à l'âge adulte, modifie sa composition. Néanmoins, le lien de causalité entre le stress prénatal, la dysbiose du microbiote intestinal et les troubles fonctionnels digestifs n'a jamais été établi. Dans un modèle murin de stress prénatal (SP), nous avons montré que la descendance adulte mâle et femelle développait une hypersensibilité viscérale associée à une dysbiose du microbiote intestinal et une absence d'inflammation macroscopique, trois caractéristiques du syndrome de l'intestin irritable. Comme l'abondance de *Ligilactobacillus murinus/animalis* était inversement corrélée à l'hypersensibilité viscérale, nous avons étudié les lipides produits par cette bactérie et identifié un lipopeptide, le C14AsnGABA. L'administration intra-colique de cette molécule restaurait une normo-sensibilité viscérale chez les souris SP.

Ces deux projets nous ont permis d'identifier des lipides ayant des propriétés anti-inflammatoires ou analgésiques produits par des bactéries présentes dans le microbiote intestinal. Ces molécules pourraient jouer un rôle dans l'interaction entre le microbiote et son hôte.