

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Neurogastroentérologie

Par

**Jacques GONZALES**

**Etudes des fonctions digestives et du système nerveux entérique  
dans les pathologies neurodéveloppementales digestives et cérébrales**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12 juin 2020

Unité de recherche : INSERM U1235 - TENS

Thèse N° :

## Rapporteurs avant soutenance :

Muriel DARNAUDERY  
Hervé BLOTTIERE

PU, Université de Bordeaux, NutriNeuro – INRA UMR1286  
DR1, AgroParis Tech - Université Paris Saclay - INRA, Institut MICALIS UMR1319

## Composition du Jury :

Président : Stanislas BRULEY DES VARANNES PU-PH, CHU de Nantes, Service de Gastroentérologie

Examineurs :  
Sidonie LAVERGNE Research Manager, Biofortis Mérieux NutriSciences  
Stanislas BRULEY DES VARANNES PU-PH, CHU de Nantes, Service de Gastroentérologie

Dir. de thèse : Hélène BOUDIN CR1, Université de Nantes, INSERM U1235 - TENS  
Co-dir. de thèse : Michel NEUNLIST DR1, Université de Nantes, INSERM U1235 - TENS

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Muriel Darnaudéry, Sidonie Lavergne, Hervé Blottière et Stanislas Bruley des Varannes, d'avoir pris le temps d'examiner et juger mes travaux.

Merci à vous, Hélène et Michel, de m'avoir permis de faire une thèse sur un sujet novateur. Merci Michel de m'avoir accueilli au sein de l'unité depuis des années, de m'avoir laissé de l'autonomie sur mes différents projets. Merci aussi pour vos conseils avisés et votre confiance. Merci Hélène pour ta patience, ton enthousiasme, ta compréhension, ta pédagogie et ta confiance pour mener à bien ce projet. Tu as toujours été disponible pour m'aider lorsque j'en avais besoin. Merci à vous deux de m'avoir donné l'occasion de faire de nombreux congrès nationaux et internationaux, me permettant de découvrir les thématiques de recherches de différents laboratoires, mais aussi de voyager. Merci aussi de m'avoir permis de faire de l'enseignement en parallèle de ma thèse, et de m'avoir laissé une liberté importante tout au long de celle-ci.

Merci aux autres membres de l'équipe autisme. Catherine pour ton aide précieuse dans nos expériences, ta gentillesse et ta patience, même si je n'ai pas toujours été très assidu sur certaines règles. Justine avec qui je vais pouvoir finir mes quelques mois au labo et qui, je suis sûr, ne va pas laisser ce beau projet mourir dans l'œuf. Merci Sophie pour nos échanges à propos de musiques alternatives et de coins sympas à Amsterdam, j'ai pu découvrir et prendre goût à l'enseignement grâce à toi.

Philippe, Tony, Isabelle, merci à vous trois de m'avoir pris en stage dans votre équipe, il y a maintenant 7 ans, quand je n'étais qu'un jeune licence. Avec vous, j'ai découvert le monde de la neurogastroentérologie, le plaisir de la recherche, et surtout l'espièglerie. Votre convivialité m'a permis d'encore me considérer dans l'équipe Naveilhan, même après avoir changé d'équipe, en venant aux repas de la team et au « petits verres au Cotep ».

Je tiens également à remercier Malvyne, pour m'avoir encouragé pendant ces 4 ans. Même si tu n'avais aucun lien d'encadrement, merci de m'avoir donné un coup de fouet quand cela était nécessaire et d'avoir su trouver les mots justes pour m'encourager dans certaines périodes (notamment celle du confinement). Merci pour ces pauses café, et ces repas dans la joie et la bonne humeur constante. Même si je n'ai jamais travaillé pour l'équipe « La Glie c'est la vie », cela aurait été et sera toujours un grand plaisir d'être de la partie (l'avenir est mystérieux), comme tu le sais

Merci à toi Morggy, d'avoir été mon acolyte pendant tes 6 mois de stage, de m'avoir supporté et d'avoir suivi la cadence. Je sais que ça a été dur au début de ton stage pour toi, j'ai mis un certain temps à m'adapter et à comprendre que je devais t'aider. Comme je le dis souvent, peu de stagiaire peuvent suivre la cadence de travail quand je suis parti et pour cela je ne te féliciterai jamais assez. Même si tu as changé de voie, une bière sera toujours de rigueur lorsque tu passeras sur Nantes.

Alice, merci pour tes nombreux conseils en Western-Blot, quand après 5 ans dans ce laboratoire j'ai décidé de me lancer dans cette technique démoniaque. Je persiste à dire que la protéine ZO-1 est une conspiration créée par la communauté scientifique pour me rendre fou. Merci à toi Julie, ma camarade de bureau tout au long de ma thèse, pour ces nombreux échanges professionnels

mais aussi extra-professionnels (avec Élise), ainsi que nos projets fous qui ne se réaliseront sûrement jamais. Merci à Élise pour toutes ces soirées et ces weekends à deux au laboratoire, entrecoupés de burger/pizza et toutes autres cochonneries culinaires.

Merci à toute l'équipe de l'U1235, pour votre disponibilité, votre bienveillance et l'ambiance de travail agréable que vous avez entretenu au cours de mon passage dans le laboratoire. Merci aux autres doctorants et stagiaires, présents ou passés, qui ont permis de maintenir une ambiance motivante, entrecoupée de sortie bière et cocktail.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des mes collègues d'enseignement à l'Université, plus particulièrement Mickaël et Chrystelle, qui ont fait le maximum pour alléger mon emploi du temps lors de ma 4<sup>e</sup> année de thèse. J'ai apprécié l'enseignement à vos côtés et ce fût une expérience enrichissante.

Merci à mes parents et à ma famille pour m'avoir soutenu et encouragé, mais également de m'avoir permis de poursuivre mes études jusqu'à ce stade.

Merci à toi Camille, ma camarade de laboratoire qui m'a injustement abandonné avant la fin de ma thèse pour partir coder en informatique. J'ai pu jouer à « Marco-polo » version U1235 dans les couloirs tel un enfant de 10 ans, apprendre les limites de mon corps, faire des concerts, nuits blanches, rencontres, etc. Toi qui m'as entraîné dans des folies de 70H de laboratoire par semaine, avec à la suite un nombre incalculable de tours à l'embuscade. Cela ne s'arrête pas au laboratoire, les congrès nous ont permis de visiter plusieurs villes et pays où les escapades nocturnes nous ont fait se sentir comme à la maison. Merci pour ces petits voyages clermontois, puis parisiens avec Tiphaine, Julie et Elodie. D'ailleurs, je compte sur vous pour les escapades dans mon futur lieu de vie.

Merci à toi Seb, d'avoir été présent pendant la période où j'en avais le plus besoin. De façon étonnante tu as su me canaliser, me permettant ainsi de me reposer pendant mes périodes de fatigue.

Claire, merci pour ces nombreux repas, grosses bouffes, tests de restaurants exotiques et variés. J'ai aussi apprécié donner des cours avec toi, cela était très constructif pour développer notre technique d'observation et d'interrogation des étudiants. Merci également pour avoir accepté de rentrer dans mes folies bucoliques ressemblant à un marathon : j'attends toujours que l'on dépasse les 15 en un soir, mais je crois en toi tu as un très bon entraîneur.

Marine, toi qui es la définition même du traquenard : « nan mais juste un petit verre rapide de 18H à 19H », et en un claquement de doigts voilà qu'il est 23H, puis 3H... 7H du matin ; que les lieux, les verres et les rencontres s'enchaînent. Merci à toi, même si je ne suis pas sûr que cela a vraiment été bénéfique pour mon travail. Cependant ces moments ont été nécessaires pour échapper au quotidien, et je serai toujours partant pour un dernier.

Merci à toi Pupu, il y aurait énormément de chose à dire à ton sujet. Qui aurait pensé il y a trois ans que l'on s'entendrait si bien. En plus d'être un super détective, un camarade de 9<sup>e</sup> avec un estomac à tout épreuve, tu as été avant tout d'un soutien hors-pair et une oreille précieuse. Merci

## Remerciements

d'avoir été là ces nombreux soirs au cercle, MTC, PM ou encore au VIP, toujours là pour me donner de très bons conseils personnels et professionnels. Merci de ta franchise absolue (en absence totale de filtre), de m'avoir forcé à me reprendre en main quand il le fallait. Tu trouves toujours les mots pour me faire rire et me changer l'esprit quelques soit les circonstances, merci encore Pupu.

Merci à vous tous mes amis : July, Elena, Jérôme, Ben, Bébé, la secte des Vigiséro, Raymond, Cyrielle, Adèle (et ceux que je n'ai pas nommés) pour ces soirées, ces repas, ces escapades qu'elles soient Nantaises, Strasbourgeoises ou même Belges, généralement sur des coups de tête. Merci à vous tous mes amis pour tous vos encouragements. Merci également à tous de m'avoir suivi à tour de rôle pour vivre ma 2<sup>e</sup> journée la nuit, d'une façon complètement nouvelle par rapport à celle du laboratoire. Je pense que ces échappées m'ont permises de passer autant d'heures au sein du laboratoire durant la journée.

Un grand merci à tous d'avoir été là.

*« La thèse est similaire à un marathon. Lorsque tu as fait la moitié,  
c'est le mental qui compte, tu ne peux plus abandonner »*

&

*« Si vous voulez un conseil, la diplomatie consiste  
souvent à paraître plus bête que l'on est »*

**Terry Pratchett**

A ces mots qui m'ont suivi au cours de ma thèse.



<b>Liste des publications et conférences.....</b>	<b>9</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des figures et tableaux.....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Etude bibliographique.....</b>	<b>5</b>
<b>Le tube digestif.....</b>	<b>5</b>
<b>I. Généralités.....</b>	<b>5</b>
<b>II. Organisation.....</b>	<b>6</b>
<b>III. Les grandes fonctions intestinales.....</b>	<b>8</b>
A. Motricité intestinale.....	8
1. Motricité de l'intestin grêle.....	8
2. Motricité du colon.....	10
B. Barrière intestinale.....	10
1. Organisation.....	10
2. Structure formant la barrière épithéliale intestinale.....	14
3. La perméabilité intestinale.....	17
4. Réparation en cas de lésion.....	20
C. Fonctions immunitaires de la BEI.....	21
D. Régulation des grandes fonctions digestives par le système nerveux.....	22
<b>Le système nerveux entérique.....</b>	<b>23</b>
<b>I. Généralités.....</b>	<b>23</b>
<b>II. Organisation.....</b>	<b>24</b>
A. Les neurones entériques.....	25
1. Les classifications des neurones entériques.....	25
2. Les différents types de neurones.....	26
3. Marqueurs neuronaux entériques.....	28
B. Les cellules gliales entériques.....	29
1. Les différents types de glie entérique.....	30
2. Les marqueurs gliaux.....	31
3. Le rôle des cellules gliales entériques.....	33
<b>III. Développement et mise en place du système nerveux entérique.....</b>	<b>35</b>
A. Embryogénèse.....	35
B. Maturation du système nerveux entérique.....	36
1. Migration et prolifération des précurseurs.....	36
2. Différenciation des précurseurs.....	39
3. Maturation du réseau nerveux.....	41
4. Maturation post-natale du réseau nerveux.....	42

<b>IV. Le rôle du système nerveux entérique dans les grandes fonctions digestives .....</b>	<b>43</b>
A. Contrôle de la motricité digestive .....	43
1. Le rôle des neurones entériques .....	43
2. Le rôle des cellules gliales entériques .....	45
B. Contrôle de la barrière épithéliale intestinale .....	46
1. Le rôle des neurones entériques .....	46
2. Le rôle des cellules gliales entériques .....	47
C. Contrôle de l'immunité digestive .....	49
1. Le rôle des neurones entériques .....	49
2. Le rôle des cellules gliales entériques .....	50
<b><i>Le microbiote intestinal .....</i></b>	<b>51</b>
<b>I. Présentation générale .....</b>	<b>51</b>
A. Classification du microbiote intestinal .....	52
B. Méthodes d'analyse .....	53
1. Méthode de culture.....	53
2. Méthode génomique.....	53
3. Mesure de la diversité bactérienne.....	56
C. Le microbiote intestinal au cours de la vie de l'hôte.....	56
1. Mise en place du microbiote intestinal chez l'enfant.....	56
2. Maintien du microbiote intestinal chez l'adulte.....	57
<b>II. Le rôle du microbiote intestinal dans les grandes fonctions digestives .....</b>	<b>59</b>
A. Effets sur la motricité digestive .....	59
B. Effets sur la barrière épithéliale intestinale .....	60
<b>III. Les médiateurs du microbiote intestinal .....</b>	<b>61</b>
A. Le lipopolysaccharide .....	61
B. Les acides gras à chaîne courte .....	61
1. Implication dans la motricité digestive.....	62
2. Implication dans la perméabilité digestive.....	63
C. Les sels biliaires .....	66
1. Implication dans la motricité digestive.....	67
2. Implication dans la perméabilité digestive.....	68
<b><i>Les troubles du spectre autistique .....</i></b>	<b>70</b>
<b>I. Généralités .....</b>	<b>70</b>
A. Diagnostic.....	71
B. Causes de la pathologie.....	73
1. Facteurs génétiques .....	73
2. Facteurs épigénétiques .....	73
3. Facteurs environnementaux.....	73
<b>II. Troubles comportementaux et atteintes centrales dans les troubles du spectre autistique...</b>	<b>75</b>
A. Troubles comportementaux.....	75
B. Atteintes du système nerveux central .....	76
<b>III. Atteintes immunitaires dans les troubles du spectre autistique .....</b>	<b>77</b>
<b>IV. Troubles digestifs et atteintes digestives dans les troubles du spectre autistique .....</b>	<b>78</b>

A. Troubles digestifs .....	78
B. Atteintes digestives .....	78
1. Modification de la motricité digestive.....	78
2. Modification de la perméabilité intestinale .....	80
3. Modification du système nerveux entérique .....	81
4. Modification du microbiote intestinal dans les troubles du spectre autistique.....	82
<b>Objectifs de thèse .....</b>	<b>85</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>87</b>
<b>Résultats complémentaires.....</b>	<b>141</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>149</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>157</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>159</b>





# Liste des publications et conférences

---

## Publications :

### Articles présentés dans la thèse :

- Jacques Gonzales, Catherine Le Berre-Scoul, Anne Dariel, Paul Bréhéret, Michel Neunlist and Hélène Boudin. **Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity: implication in Hirschsprung disease**. En revision dans Scientific Reports.
- Jacques Gonzales, Laetitia Aymeric, Justine Marchix, Marie Burel, Catherine Le Berre-Scoul, Alexandru Gaman, Françoise Le Vacon, Marion Leboyer, Hélène Boudin\* and Michel Neunlist\*. **Fecal supernatants from individuals with autism spectrum disorder induced impaired digestive functions and remodeling of the intestinal epithelial barrier and enteric nervous system**. En preparation.

### Articles non présentés dans la thèse :

- Kermarrec, L., Durand, T., Gonzales, J., Pabois, J., Hulin, P., Neunlist, M., Neveu, I., and Naveilhan, P. (2019). **Rat enteric glial cells express novel isoforms of Interleukine-7 regulated during inflammation**. Neurogastroenterol. Motil. *31*, e13467.
- Prigent, A., Gonzales, J., Durand, T., Le Berre-Scoul, C., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2019). **Acute inflammation down-regulates alpha-synuclein expression in enteric neurons**. J. Neurochem. *147*, 746-760.
- Lionnet, A., Wade, M.A., Corbillé, A.-G., Prigent, A., Paillusson, S., Tasselin, M., Gonzales, J., Durieu, E., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., et al. (2018). **Characterization of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy**. Acta Neuropathol Commun *6*, 65.

### Reuves :

- Vanhaecke, T., Gonzales, J., Neunlist, M., and Boudin, H. (2017). **Coévolution de l'axe microbiote-intestin-cerveau : fonctions et conséquences physiopathologiques**. La Lettre des neurosciences n°52, ISSN 2117-5635.

### Reuves sans comité de lecture :

- Boudin, H., Gonzales, J., Derkinderen, P., and Neunlist, M. (2018). **Le microbiote, l'intestin et le cerveau**. Phytothérapie *16*, 316-319.

## Communications Orales :

- **Role of Semaphorin 3A in the postnatal development of the enteric nervous system**. ESNM (European Society of Neurogastroenterology and Motility) 2017 - Cork, Ireland.

- **Effets des surnageants fécaux de patients atteints de troubles du spectre autistique sur l'unité neuro-glio-épithéliale in vitro.** PPB (Physiopathologie des Barrières) 2018 - Nantes, France
- **Effects of fecal supernatant from Autism Spectrum Disorder patients on intestinal epithelial barrier and enteric nervous system.** FNM (Federation of Neurogastroenterology and Motility) 2018 - Amsterdam, Pays-Bas. JFHOD (Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive) 2019 - Paris, France. GFNG (Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie) 2019 - Toulouse, France. 23<sup>e</sup> meeting annuel du réseau LARC Neurosciences 2019 - Nantes, France. NeuroFrance 2019 - Marseille, France

### Communications Posters :

- **Role of Semaphorin 3A in the postnatal development of the enteric nervous system.** GFNG 2017 - Nantes, France (*Prix de la meilleure présentation de poster*). UEGW (United European Gastroenterology Week) 2017 - Barcelone, Espagne. 22<sup>e</sup> meeting annuel du réseau LARC-Neurosciences 2018 - Rouen, France. 23<sup>e</sup> meeting annuel du réseau LARC Neurosciences 2019 - Nantes, France.
- **Effects of fecal supernatant from Autism Spectrum Disorders patients on intestinal epithelial barrier and enteric nervous system.** DHU 2020 école d'automne (Département Hospitalo-Universitaire) 2017 et 2018 - Nantes, France. FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Forum of Neurosciences 2018 - Berlin, Allemagne. Autism Europe 2019 - Nice, France. PPB 2019 - Nantes, France (*Prix de la meilleure présentation de poster*). UEGW (United European Gastroenterology Week) 2019 - Barcelone, Espagne.
- **Fecal supernatant screening from autism spectrum disorder patients on human colonic organoids.** DHU 2020 école d'automne 2018 - Nantes, France

# Abréviations

---

<b>5-HT :</b>	Sérotonine	<b>IPANs :</b>	Neurones Afférents Intrinsèques Primaires
<b>Ach :</b>	AcétylCholine	<b>JAM :</b>	Junctional Adhesion Molecule
<b>ADI-R :</b>	Autism Diagnostic Interview-Revised	<b>LCA :</b>	Acide Lithocholique
<b>ADOS :</b>	Autism Diagnostic Observation Schedule	<b>MAP-2 :</b>	Microtubule Associated Protein-2
<b>AGCC :</b>	Acides Gras à Chaîne Courte	<b>MEC :</b>	Matrice Extra-Cellulaire
<b>AH :</b>	After Hyperpolarization	<b>MLC(K) :</b>	Myosine Light Chain (Kinase)
<b>AMPs :</b>	Peptides AntiMicrobiens	<b>NCC :</b>	Progéniteurs neuraux entériques dérivés des crêtes neurales
<b>ATP/ADP :</b>	Adénosine Tri/DiPhosphate	<b>NF-200 :</b>	Neurofilaments-200
<b>BEI :</b>	Barrière Épithéliale Intestinale	<b>NGF :</b>	Neuronal Growth Factor
<b>BMP :</b>	Bone Morphogenetic Protein	<b>NO(S) :</b>	Nitric Oxyde (Synthase)
<b>CA :</b>	Acide Cholique	<b>NSE :</b>	Neuronal Specific Enolase
<b>CARS :</b>	Childhood Autism Rating Scale	<b>OTU :</b>	Unité Taxonomique Opérationnelle
<b>CDCA :</b>	Acide ChénoDésoxyCholique	<b>P8 :</b>	8 <sup>e</sup> jour postnatal
<b>CEI :</b>	Cellules Épithéliales Intestinales	<b>PGP9.5 :</b>	Protein Gene Product 9.5
<b>CGE :</b>	Cellules Gliales Entériques	<b>PLP-1 :</b>	ProteoLipid Protein-1
<b>ChAT :</b>	Choline Acétyl Transférase	<b>PRR :</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>CIC :</b>	Cellules Interstitielles de Cajal	<b>SNC :</b>	Système Nerveux Central
<b>DCA :</b>	Acide DésoxyCholique	<b>SNE :</b>	Système Nerveux Entérique
<b>DGGE/TGGE :</b>	Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant / de température	<b>SPF :</b>	Specific Pathogen Free
<b>DSM :</b>	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders	<b>SRS :</b>	Social Responsiveness Scale
<b>E8 :</b>	8 <sup>e</sup> jour embryonnaire	<b>Syn-1 :</b>	Synapsine-1
<b>FAK :</b>	Focal Adhesion Kinase	<b>TGFβ :</b>	Transforming Growth Factor β
<b>FISH :</b>	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence	<b>TLR :</b>	Toll-Like Receptor
<b>GABA :</b>	Acide γ amino-butyrrique	<b>TNFα :</b>	Tumor Necrosis Factor α
<b>GDNF :</b>	Gliial Derived Neurotrophic Factor	<b>T-RFLP :</b>	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux
<b>GFAP :</b>	Gliial Fibrillary Acid Protein	<b>TSA :</b>	Troubles du Spectre Autistique
<b>GSNO :</b>	Gliad derived S-NitroGlutathione	<b>Tub-βIII :</b>	Tubuline β-III
<b>HDAC :</b>	Histones DésACétylases	<b>UDCA :</b>	Acide UrsoDésoxyCholique
<b>IFNγ :</b>	Interféron γ	<b>VIP :</b>	Vaso-Intestinal Peptide
<b>IL :</b>	InterLeukine	<b>ZO :</b>	Zonula Occluden



# Liste des figures et tableaux

---

## Liste des figures :

Figure 1 : Anatomie du système digestif chez l'Homme .....	5
Figure 2 : Schéma de la paroi du tube digestif chez l'Homme. ....	6
Figure 3 : Organisation de l'épithélium de l'intestin grêle. ....	8
Figure 4 : Les mécanismes de motricité de l'intestin grêle. ....	9
Figure 5 : Les cellules épithéliales intestinales forment une barrière biochimique et physique contre les pathogènes extérieurs. ....	11
Figure 6 : Le mucus intestinal est différent selon la localisation dans le tube digestif. ....	13
Figure 7 : Schéma récapitulatif des complexes de jonctions au sein de la barrière épithéliale intestinale. ....	15
Figure 8 : L'assemblage d'un hétéro ou homohexamère de connexine forme un connexon. ....	16
Figure 9 : Les adhésions focales permettent un attachement de la cellule via son cytosquelette à la matrice extracellulaire. ....	17
Figure 10 : Schéma récapitulatif des différentes phases de réparation de la barrière épithéliale intestinale en cas de lésion. ....	20
Figure 11 : L'innervation du tractus gastro-intestinal. ....	22
Figure 12 : Organisation du système nerveux entérique. ....	24
Figure 13 : Classification des différents types Dogiel de neurones. ....	25
Figure 14 : Marquage immunohistochimique d'un plexus sous-muqueux de colon humain par des marqueurs pan-neuronaux. ....	29
Figure 15 : Immunomarquage de ganglions myentériques in vitro avec des marqueurs neuronaux. ....	29
Figure 16 : Coupe schématique d'un intestin avec localisation des cellules gliales entériques. ....	30
Figure 17 : Marquage unitaire de cellules gliales entériques dans le plexus myentérique murin. ....	31
Figure 18 : Expression de GFAP et S100 $\beta$ par la glie entérique dans le plexus myentérique de l'iléon. ....	32
Figure 19 : Expression de Sox10 et S100 $\beta$ par la glie entérique dans le plexus myentérique de l'iléon. ....	33
Figure 20 : Expression des marqueurs gliaux dans le plexus myentérique de colon de souris. ....	33
Figure 21 : Migration des progéniteurs dérivés des crêtes neurales dans l'intestin primitif. ....	36
Figure 22 : Schématisation des récepteurs des séphorines sécrétées ou liées aux membranes. ....	39
Figure 23 : Représentation de la différenciation progressive des NCC en cellules entériques de la crête neurale (ENCC) puis en neurones et cellules gliales entériques. ....	40
Figure 24 : Développement temporel du SNE. ....	42
Figure 25 : Mise en place du réseau nerveux au sein du tube digestif dans les périodes post-natales chez le raton. ....	43
Figure 26 : Jonction neuromusculaire du tube digestif mettant en jeu les cellules interstitielles de Cajal. ....	44
Figure 27: Représentation simplifiée du circuit de contrôle moteur. ....	45
Figure 28 : Schématisation de l'implication des cellules gliales entériques dans le réflexe péristaltique. ....	46
Figure 29 : Co-expression de PLP1 et S100 $\beta$ à proximité de l'épithélium dans l'intestin murin adulte. ....	48
Figure 30 : Régulation des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par les neurones et les cellules gliales entériques. ....	49
Figure 31 : Vue d'ensemble des réponses gliales entériques en relation avec l'inflammation. ....	51
Figure 32 : Représentation des facteurs du microbiote et de l'hôte le long de l'axe gastro-intestinal. ....	52
Figure 33 : Classification des bactéries. ....	52
Figure 34 : Vue d'ensemble des techniques utilisées pour la caractérisation du microbiote intestinal. ....	54
Figure 35 : Facteurs influençant le microbiote intestinal au cours de la vie. ....	57
Figure 36 : Représentation schématique du phénomène de résilience du microbiote intestinal. ....	59

<i>Figure 37 : Le microbiote intestinal régule la mise en place et la fonction du système nerveux entérique.</i>	60
<i>Figure 38 : Le microbiote intestinal est indispensable à la maturation et à l'établissement de la barrière épithéliale intestinale.</i>	60
<i>Figure 39 : Représentation schématique des effets des acides gras à chaîne courte à dose physiologique sur le système nerveux entérique.</i>	63
<i>Figure 40 : Représentation schématique des effets des acides gras à chaîne courte à dose physiologique sur les cellules épithéliales intestinales.</i>	66
<i>Figure 41 : Sels biliaires primaires, secondaires et tertiaires chez l'Homme.</i>	67
<i>Figure 42 : Représentation schématique des effets des sels biliaires secondaires sur les cellules épithéliales intestinales.</i>	70
<i>Figure 43 : Dose réponse des surnageants fécaux sur les fonctions de barrière d'une monocouche cellulaire de Caco-2.</i>	142
<i>Figure 44 : Evaluation de la toxicité et du pH des surnageants fécaux.</i>	143
<i>Figure 45 : Mesure des paramètres de barrière d'une monocouche cellulaire de Caco-2.</i>	144
<i>Figure 46 : Le traitement aux surnageants fécaux dans un modèle complexe in vitro n'altère pas l'expression des molécules gliales et neuronales.</i>	145
<i>Figure 47 : Les surnageants fécaux induisent des modifications de l'expression génique et protéique de façon région spécifique.</i>	145
<i>Figure 48 : Proportion relative des phyla bactériens dans nos échantillons.</i>	146

### **Liste des tableaux :**

<i>Tableau 1 : Marqueurs des neurones entériques et leur localisation cellulaire.</i>	28
<i>Tableau 2 : Techniques utilisées pour caractériser le microbiote intestinal avec leurs avantages et leurs inconvénients détaillés.</i>	54

# Introduction générale

---

Les troubles du spectre autistique (TSA) regroupent un ensemble de pathologies neuro-développementales caractérisées par des difficultés de communication, des déficits d'interaction sociale, des mouvements stéréotypés et/ou des centres d'intérêt restreints. Actuellement, la prévalence de ces troubles est de l'ordre de 1 à 2% dans les pays développés, avec une augmentation constante partiellement due à un raffinement des techniques de diagnostic, à une augmentation de l'accès aux soins mais également une modification de la définition des TSA au cours des années. Les TSA sont trois à quatre fois plus fréquents chez les garçons que chez les filles, sans dépendance du groupe ethnique ou de la classe socio-économique à laquelle l'enfant appartient.

Cette condition psychiatrique est un trouble neuro-développemental qui débute précocement et peut être généralement diagnostiquée avant trois ans chez le jeune enfant. Cependant, malgré un diagnostic précoce de la pathologie, aucun traitement curatif n'existe à l'heure actuelle impliquant que cette condition affecte aussi de nombreux adultes.

Les causes d'apparition de la pathologie sont inconnues mais semblent dépendre de plusieurs éléments impliquant à la fois des facteurs environnementaux comme des pesticides, des polluants ou une infection maternelle, et des facteurs génétiques tels qu'une mutation des protéines de connectivité neuronale ou de condensation de la chromatine. Les TSA sont caractérisés par des modifications des structures centrales et des défauts de connectivité, mais il est important de noter que 20 à 90% des patients atteints de TSA se plaignent de troubles digestifs, affectant l'ensemble du tube digestif et impactant fortement leur qualité de vie. Malgré la constatation de ces troubles digestifs récurrents, les dysfonctions gastro-intestinales chez les patients atteints de TSA sont encore peu étudiées.

Le tube digestif joue un rôle essentiel dans la survie des organismes en leur fournissant les sources d'énergie nécessaires à leur survie. Ce rôle est assuré par des fonctions de transport, de digestion des aliments et également d'absorption des nutriments et des électrolytes. En outre, le tube digestif exerce aussi une fonction importante de protection et de réparation vis-à-vis des pathogènes et des agressions extérieures auxquels il est soumis en permanence. Cette fonction est assurée par la barrière épithéliale intestinale (BEI), constituée d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI). Cette fonction de BEI est aussi régulée par les composants cellulaires de son microenvironnement comme le système immunitaire digestif et le microbiote intestinal.

Parmi les autres constituants du tube digestif, le système nerveux entérique (SNE) joue un rôle-clé dans le maintien de l'homéostasie digestive et en particulier dans l'homéostasie de la BEI. En effet, le SNE est un système nerveux autonome et intégratif, présent tout le long du tractus digestif et composé de neurones entériques, de cellules gliales entériques (CGE) et de cellules souches neurales. Le SNE est organisé en ganglions formant deux plexus principaux, les plexus myentérique et sous-muqueux, régulant les fonctions de motricité et de la BEI respectivement. Le SNE est issu des cellules des crêtes neurales qui colonisent précocement le tube digestif pendant



la fin de la période embryonnaire chez l'Homme. Nonobstant, le SNE poursuit sa maturation durant la période périnatale et contribue de façon importante à la mise en place des fonctions digestives chez le nouveau-né. **A ce jour, les mécanismes responsables de la maturation du SNE restent à être mieux identifiés.**

Le SNE est sous l'influence de divers facteurs externes tels que des efférences cérébrales, le système immunitaire, mais également sous l'influence du microbiote. La période périnatale est une période particulièrement clef de la vie durant laquelle la sensibilité du SNE à des facteurs environnementaux est importante. En effet, l'impact de ces facteurs sur le développement et la maturation du SNE pourrait non seulement contribuer à des troubles digestifs chez le nouveau-né, mais aussi induire de manière définitive des dysfonctions du SNE tout au long de la vie. Les modifications du SNE, induites par de tels facteurs et caractérisées par des altérations phénotypiques neuronales (codage neurochimique, activité électrophysiologique, survie) et sont aussi nommées neuropathies entériques. Elles ont largement été décrites comme pouvant contribuer aux troubles digestifs dans de nombreuses pathologies digestives (maladie inflammatoire chronique de l'intestin, maladie de Hirschsprung, syndrome de l'intestin irritable, etc.) ou même extradigestives telles que les syndromes métaboliques ou la Maladie de Parkinson. **Néanmoins, les atteintes du SNE dans les pathologies neurodéveloppementales centrales ainsi que les facteurs et mécanismes responsables restent à être identifiés. Parmi les facteurs potentiellement impliqués dans ce remodelage, le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle crucial.**

En effet, le microbiote intestinal désigne l'ensemble des micro-organismes présents au niveau du lumen de notre tube digestif. Le microbiote intestinal est un élément dynamique évoluant tout au long de la vie de l'hôte en fonction de facteurs extérieurs comme le mode de naissance, le lieu de vie, l'alimentation, la prise de médication, etc. Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans différentes fonctions de l'hôte comme par exemple la digestion des fibres ou l'absorption de nutriments. Plus particulièrement, il contribue de manière centrale au développement et à la maturation du SNE durant la période post-natale. Il agit sur les cellules de l'hôte par l'intermédiaire de composants structuraux des micro-organismes le constituant (paroi bactérienne, ADN bactériens, etc.), mais également par des métabolites synthétisés et libérés dans la lumière digestive. Ces interactions avec l'hôte sont déterminantes pour le nombre de neurones et de cellules gliales, ainsi que pour les processus de différenciation du codage neurochimique ou de la migration des cellules dans la paroi intestinale.

Chez les patients atteints de TSA, le microbiote intestinal est altéré. Cette dysbiose est accompagnée par des différences de concentration en acides gras à chaîne courte et en sels biliaires, ceci étant démontré chez l'Homme ainsi que dans des modèles animaux. Les métabolites bactériens modifiés sont connus pour leurs implications dans la modulation des fonctions digestives en affectant directement ou indirectement la BEI et le SNE. De plus, ils sont capables d'influencer le système nerveux central (SNC) en modifiant le contexte inflammatoire cérébral voire même en modifiant directement les fonctions cognitives.

Néanmoins, dans les TSA la capacité du microbiote intestinal à induire des modifications du SNE et les conséquences de ce remodelage sur les fonctions digestives restent à ce jour largement inconnues.

**Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse s'est organisé autour de deux axes principaux. D'une part, le premier axe cherchait à mieux appréhender les mécanismes responsables de la maturation du SNE et en particulier le rôle de la molécule sémaphorine 3A. D'autre part, le deuxième axe visait à caractériser la capacité du microbiote de patients atteints de TSA à induire des modifications du SNE et des fonctions digestives, ainsi qu'à identifier les facteurs bactériens responsables de ces effets.**



# Etude bibliographique

## Le tube digestif

### I. Généralités

L'appareil digestif est un organe central dans l'évolution et la survie des organismes pluricellulaires. Ce dernier participe à la digestion des aliments, permet l'extraction des nutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, mais représente également une interface directe avec l'environnement extérieur.

Le tube digestif est un organe interne mesurant en moyenne huit mètres de long chez l'adulte. Il s'étend de la bouche à l'anus et forme une succession d'organes : la bouche, le pharynx, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), le gros intestin (colon ascendant, transverse, descendant, rectum) puis en dernier lieu l'anus (Figure 1) (Marieb and Lachaine, 2005). L'ensemble participe à la digestion et l'absorption des nutriments mais aussi à l'élimination des déchets de l'organisme. En plus de ces fonctions de nutrition et de défense, le tube digestif possède une fonction de motricité digestive, de sécrétion de facteurs de protection, de perméabilité et d'immunité.

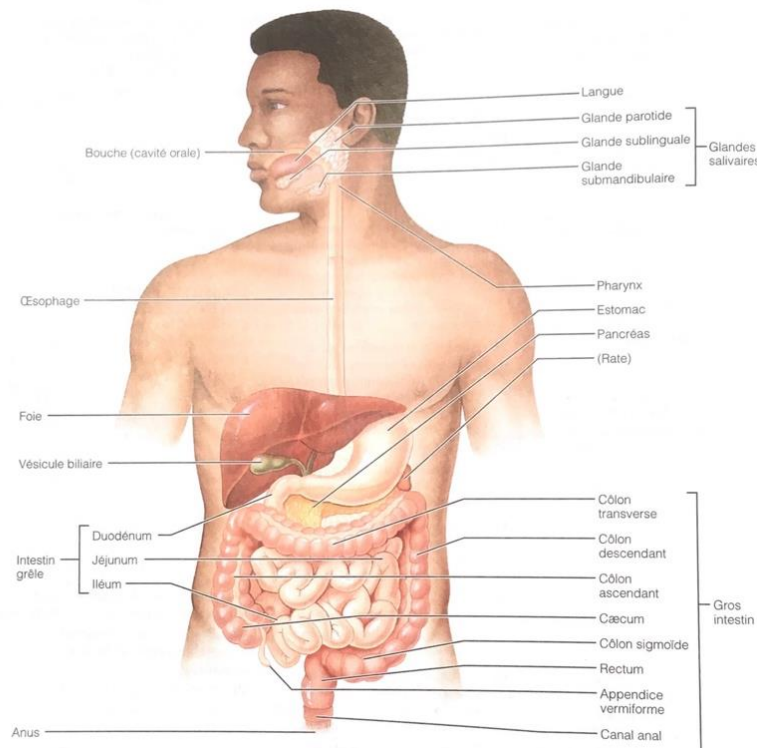


Figure 1 : Anatomie du système digestif chez l'Homme. (Marieb and Lachaine, 2005).

## II. Organisation

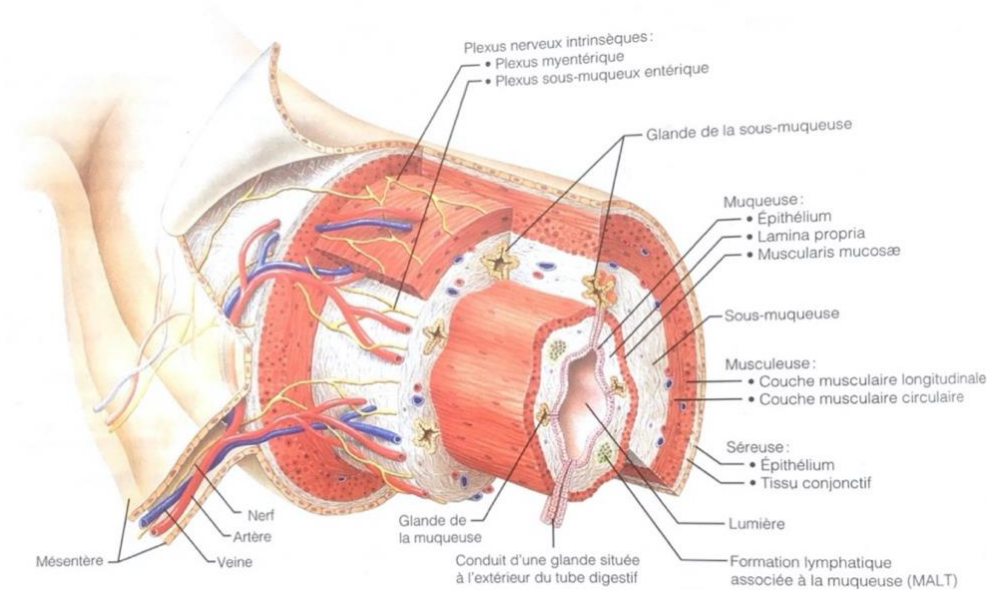


Figure 2 : Schéma de la paroi du tube digestif chez l'Homme.

La paroi intestinale se compose de quatre couches principales : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculature et la séreuse (Marieb and Lachaine, 2005).

De l'œsophage à l'anus, le tube digestif est constitué de différentes couches tissulaires (Figure 2), présentes au nombre de quatre :

- La tunique externe : un tissu conjonctif lâche permettant le maintien des organes entre eux. Elle porte deux dénominations différentes en fonction de la zone concernée : l'adventice pour la partie du tube digestif située dans la cavité thoracique, ou la séreuse pour la partie située dans la cavité abdomino-pelvienne.
- La tunique musculaire : composée de fibres musculaires lisses longitudinales et circulaires permettant de produire les contractions/relaxations.
- La sous-muqueuse : composée par un tissu conjonctif lâche avec une vascularisation et une innervation importantes.
- La muqueuse : la couche la plus interne du tube digestif, composée d'un épithélium tapissant le lumen du tube digestif, et reposant sur du tissu conjonctif lâche (lamina propria) et sur la muqueuse musculaire.

La tunique musculaire est impliquée dans la motricité digestive, permet un péristaltisme (contraction/relaxation), et facilite l'avancée et le brassage du bolus alimentaire tout le long du tractus digestif. La motricité digestive est notamment sous le contrôle du SNE présent au sein de cette tunique musculaire (voir le paragraphe : Le système nerveux entérique).

L'épithélium du tube digestif est présent tout le long du tube digestif et assure, en plus de son rôle d'absorption des nutriments, un rôle de protection de l'organisme contre le contact direct avec le bolus alimentaire. Cet épithélium forme également une barrière physique et biochimique contre la flore commensale, nommée microbiote intestinal, mais surtout contre les micro-organismes pathogènes. La composition de cet épithélium est variable selon la partie du tube digestif concernée. En effet, l'épithélium qui tapisse la partie la plus haute du tube digestif (bouche et

œsophage) ainsi que le canal anal, est constitué d'un épithélium stratifié squameux non kératinisé présentant plusieurs couches de cellules épithéliales, protégeant le tube contre le bolus alimentaire.

Le terme barrière épithéliale intestinale (BEI) sera dans ce manuscrit employé pour définir l'épithélium digestif tapissant la partie basse de l'œsophage jusqu'au rectum. En fonction de la localisation dans le tube digestif, la BEI possède une organisation très différente avec des sous-types cellulaires spécifiques permettant ainsi à chaque zone d'avoir sa propre fonction.

Au niveau de l'estomac, les cellules épithéliales produisent un mucus protecteur de deux couches d'épaisseur permettant la lubrification de la paroi et la protection contre le suc gastrique. En plus de cela, la muqueuse de l'estomac comporte des cryptes avec un ensemble de cellules servant à la production de mucus acide ou d'enzymes de digestion telles que la pepsine ou la gastrine.

Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium permet l'absorption des nutriments mais également des vitamines, de l'eau et des électrolytes. Une autre fonction importante de la BEI dans cette partie du tube est la protection contre les agents pathogènes extérieurs ou des composés toxiques pour l'organisme.

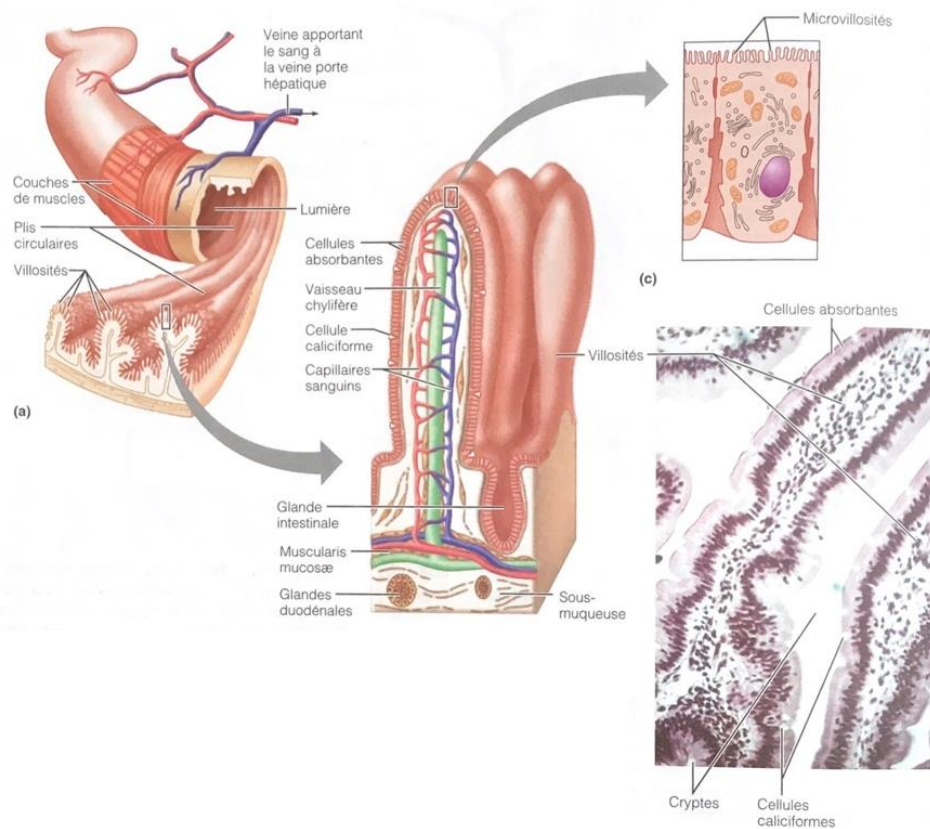
Au niveau du colon, les résidus alimentaires sont digérés par les bactéries intestinales et l'absorption de l'eau est importante. Les résidus sont ensuite transformés en fèces, emmagasinés et concentrés temporairement au niveau du rectum jusqu'au moment de la défécation. L'épithélium produit un mucus abondant permettant ainsi le passage des selles dans le colon sans atteinte de l'épithélium digestif.

Cette différence de fonction pour chaque partie du tube digestif est assurée par une organisation spécifique de l'épithélium intestinal selon les régions du tube digestif.

L'intestin grêle est composé de trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Il comporte une multitude de plis circulaires, de villosités intestinales et de microvillosités permettant d'augmenter grandement sa surface d'échange au point d'arriver à une surface totale intestinale de 300 m<sup>2</sup> chez l'Homme (Figure 3). Les plis circulaires ou valvules conniventes sont des replis profonds et permanents de la muqueuse et sous-muqueuse pouvant atteindre jusqu'à 1 cm. Ils permettent de ralentir l'avancée du bolus alimentaire pour une meilleure absorption des nutriments. Les villosités intestinales quant à elles sont d'une taille plus petite (environ 1 mm) et sont constituées de cellules épithéliales intestinales (CEI) absorbantes, permettant un échange important avec le riche réseau capillaire présent au pôle baso-latéral de cette monocouche épithéliale. Ces villosités de grandes tailles et larges dans le duodénum s'affinent et se réduisent au fur et à mesure de l'avancée vers la partie distale du tube digestif. En dernier lieu les microvillosités, présentes au nombre de 2.000 à 3.000 par cellule épithéliale, sont de minuscules invaginations de la membrane des cellules absorbantes de la muqueuse donnant ainsi une apparence de bordure en brosse.

Au niveau de l'intestin grêle se fait l'absorption majoritaire de nutriments tels que les produits de dégradation des glucides, des lipides, des protéines, des acides nucléiques mais également des vitamines, de l'eau et des électrolytes. Cette absorption se fait de manière passive et active.

Au niveau du colon, la muqueuse intestinale est plus épaisse, cette dernière ne possède ni pli circulaire, ni villosité et est uniquement composée de cryptes. Cette muqueuse a pour but d'absorber majoritairement de l'eau et des électrolytes provenant des résidus du bolus alimentaire, le principal des nutriments ayant déjà été absorbé au niveau de l'intestin grêle.



**Figure 3 : Organisation de l'épithélium de l'intestin grêle.**

Les replis circulaires, les villosités et les microvillosités augmentent la surface d'échange de l'épithélium intestinal avec la lumière du tube digestif permettant une meilleure absorption des nutriments (Marieb and Lachaine, 2005).

## III. Les grandes fonctions intestinales

### A. Motricité intestinale

La motricité intestinale est régulée par différents programmes moteurs dont les deux plus importants sont le péristaltisme et la segmentation. Ces mouvements permettent la progression du bolus alimentaire vers l'anus et sont principalement régis par le plexus myentérique du SNE (voir paragraphe : Le rôle du système nerveux entérique dans les grandes fonctions digestives).

#### 1. Motricité de l'intestin grêle

L'activité musculaire au niveau de l'intestin grêle permet de remplir trois fonctions :

- 1) Le mélange ou brassage continu du bolus alimentaire aux sécrétions digestives.
- 2) Le mouvement de va-et-vient permettant le contact des nutriments avec la muqueuse.
- 3) La propulsion du bolus intestinal vers le colon.

#### a. La segmentation

La segmentation dans l'intestin grêle permet la digestion et l'absorption des nutriments grâce à un mélange du bolus alimentaire avec des enzymes digestives et l'exposition directe des

nutriments à l'épithélium intestinal, facilitant donc leur absorption. C'est une contraction du tube digestif qui permet le brassage du bolus alimentaire et un avancement lent du bolus alimentaire pour une digestion et une absorption complète.

La segmentation commence par des contractions des muscles lisses de la couche circulaire séparant l'intestin en différents segments précis. Les parties non contractées se contractent à leur tour, aboutissant à une segmentation du chyme (Figure 4). Puis les premières parties contractées se relâchent après 5-6 secondes de contractions. Ces contractions dites annulaires et oscillantes, déclenchées par des cellules rythmiques intrinsèques situées dans le muscle lisse, permettent ainsi un mouvement de va-et-vient du bolus alimentaire. Au niveau du duodénum, la segmentation est rapide, environ douze séquences par minute, et ralentit au fur et à mesure de l'avancement dans le tube digestif avec par exemple seulement huit séquences par minute dans l'iléon (Tortora and Derrickson, 2013).

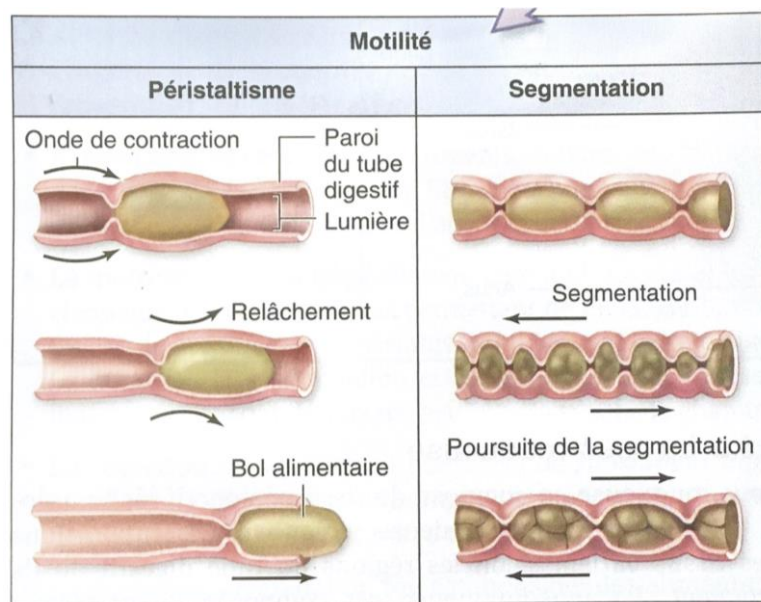


Figure 4 : Les mécanismes de motricité de l'intestin grêle.

*Le processus de segmentation est possible grâce aux contractions musculaires donnant un mouvement de va-et-vient du contenu luminal, le brassant ainsi avec les sécrétions intestinales et permettant une meilleure absorption des nutriments. Le péristaltisme est un enchaînement de contractions et relaxations du muscle servant à propulser le contenu luminal le long du tube digestif (McKinley et al., 2014).*

### b. Le péristaltisme

Le péristaltisme se définit comme une alternance de contractions musculaires involontaires des muscles circulaires et lisses longitudinaux permettant de faire avancer le bolus alimentaire en direction du colon. Ce péristaltisme a lieu suite à la distension de la paroi intestinale, une contraction du muscle du côté oral du bolus alimentaire accompagnée d'une relaxation du côté aboral (Figure 4). Le rythme de ces contractions est de moins en moins rapide à mesure que le bolus avance dans le tube digestif (McKinley et al., 2014).

Chaque contraction péristaltique parcourt lentement l'intestin grêle à raison d'une distance de 10 à 70 cm à la fois avant de disparaître, et les ondes prennent naissance en un point de plus en plus distal à chaque cycle de contraction pour faire avancer le bolus alimentaire (Marieb and Lachaine, 2005).



### c. Les complexes migratoires moteurs

Ce type de mouvement n'apparaît qu'une fois la majeure partie de l'absorption des nutriments effectuée. Ce mouvement est assimilé à du péristaltisme et les ondes le constituant prennent naissance en un point de plus en plus distal. Ce mouvement de l'entrée du duodénum à la sortie de l'iléon dure entre une demi-heure et deux heures. Il est indispensable à l'homéostasie digestive car il permet de récupérer le reste de nourriture ainsi que les bactéries, les CEI détachées et autres débris pour les apporter à l'entrée du colon. C'est une fonction dite d'entretien qui est essentielle au bon fonctionnement digestif car elle empêche la prolifération des bactéries du colon vers l'intestin grêle (Marieb and Lachaîne, 2005).

## 2. Motricité du colon

Il existe plusieurs types de mouvements au niveau du colon : le péristaltisme, les contractions haustrales et le mouvement de masse.

### a. Le péristaltisme

Le péristaltisme du colon est constitué d'ondes lentes et faibles, et possède une fréquence moins élevée que celle de l'intestin grêle avec trois à douze contractions par minute (Tortora and Derrickson, 2013).

### b. Les contractions haustrales

Les contractions haustrales se produisent lors d'une distension ou d'un relâchement de la paroi colique. Cette distension permettant le remplissage du colon par les substances digérées ou de la matière fécale, stimule un réflexe de contractions qui permet une contraction haustrale. Ces contractions sont similaires à un mouvement de segmentation lente qui se produit toutes les 30 minutes environ, et sont de ce fait les plus fréquentes au niveau du colon. Les contractions haustrales poussent les excréments jusqu'à la partie suivante tout en permettant un brassage du contenu luminal et donc une meilleure absorption de l'eau et d'électrolytes résiduels (Marieb and Lachaîne, 2005).

### c. Le mouvement de masse

Le mouvement de masse correspond à des ondes péristaltiques puissantes qui propulsent les matières fécales en direction du rectum. L'onde commence généralement au milieu du colon transverse et pousse la matière fécale vers le colon descendant puis le rectum (McKinley et al., 2014). Ces ondes parcourent de grandes sections du colon trois à quatre fois par jour, généralement après les repas, suite à la présence d'aliments dans l'estomac (par le réflexe gastro-colique) (Marieb and Lachaîne, 2005).

## B. Barrière intestinale

### 1. Organisation

Le maintien de l'épithélium digestif, aussi appelé homéostasie digestive, a été défini par Claude Bernard en 1865, à partir des termes grecs *homoios* (= similaire) et *stasis* (= stabilité), et se définit comme « la capacité de régulation de l'organisme à maintenir les différentes constantes entre les valeurs dites normales et ce malgré l'intervention d'acteurs externes ». Pour maintenir cette homéostasie digestive, l'épithélium est en perpétuel renouvellement tous les trois à cinq jours

chez l'Homme, avec une perte d'environ  $10^{11}$  CEI par jour. Ce renouvellement constant a pour fonction finale de maintenir l'homéostasie digestive en protégeant contre les pathogènes et en éliminant les cellules infectées ou lésées (Wells et al., 2017).

De plus, les CEI formant la barrière sont capables de réagir à des stimuli et de répondre en conséquence pour assurer leur rôle de barrière et apporter une réponse adéquate aux stimuli ou agressions. Pour renforcer ce mécanisme de protection, un renouvellement continu des CEI tous les trois à cinq jours s'effectue au long de la vie de l'hôte grâce à des phénomènes de prolifération, de différenciation et de desquamation cellulaire (Zhang et al., 2015).

Cette réponse protectrice adaptative peut être possible car l'épithélium digestif est composé de plusieurs types cellulaires, provenant des mêmes cellules souches épithéliales présentes au fond des cryptes intestinales. Une fois différenciées, les cellules migrent le long de l'axe cryptovillositaire (Peterson and Artis, 2014), à l'exception des cellules de Paneth qui restent au fond des cryptes.

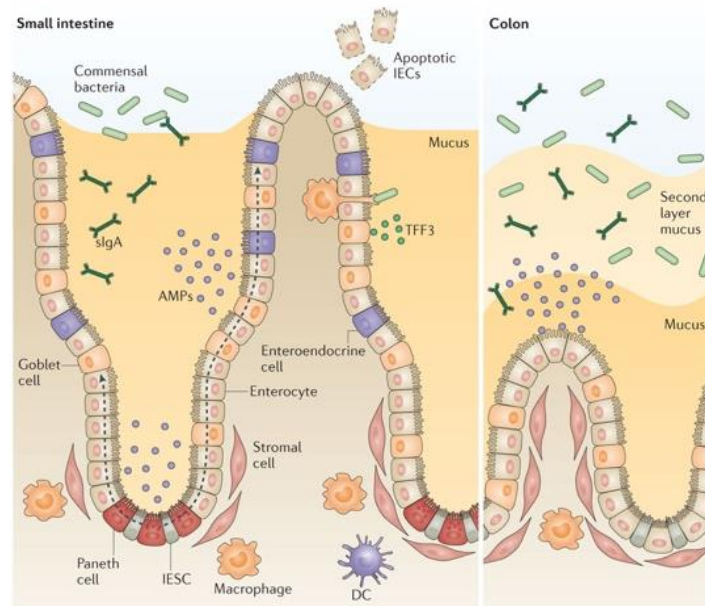


Figure 5 : Les cellules épithéliales intestinales forment une barrière biochimique et physique contre les pathogènes extérieurs. Les cellules souches épithéliales sont à la base des cryptes et sont l'origine cellulaire pour le renouvellement continu de la barrière intestinale. A l'exception des cellules de Paneth qui restent au niveau des cryptes, l'ensemble des cellules différenciées migrent sur l'axe crypto-villositaire (Peterson and Artis, 2014).

Au niveau de la BEI (Figure 5), sept types cellulaires sont retrouvés : les cellules souches intestinales, les cellules de Paneth, les cellules caliciformes, les entérocytes, les cellules entéroendocrines, les cellules M et les cellules Tuft (Salvo Romero et al., 2015).

#### a. Les cellules souches intestinales

Les cellules souches intestinales prolifèrent et donnent des cellules filles, nommées cellules proliférantes TA (pour Transit-Amplifying) ou progéniteurs TA. A la suite de plusieurs divisions cellulaires, ces cellules se différencient en plusieurs sous-types cellulaires : les cellules caliciformes, les entérocytes, les cellules entéroendocrines, les cellules Tuft afin d'assurer un renouvellement continu de l'épithélium intestinal (Barker, 2014).

### b. Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont présentes exclusivement au niveau de l'intestin grêle dans les cryptes de Lieberkühn en condition physiologique. Contrairement aux autres types cellulaires dérivés des cellules souches épithéliales intestinales, ces cellules ne migrent pas au sommet des villosités mais restent au niveau de la base de la crypte. Elles ont une durée de vie supérieure aux autres types cellulaires (supérieure à 30 jours). Elles possèdent une forme pyramidale et sont de grande taille, caractérisées par un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi conséquents leur permettant d'être de vraies « usines à protéines » (Stappenbeck, 2009).

En effet les cellules de Paneth représentent les producteurs principaux de peptides/protéines antimicrobiens tels que les  $\alpha$ -défensines, les phospholipases A2, le lysozyme C, qu'elles relâchent dans le lumen intestinal (Holly and Smith, 2018). Les peptides antimicrobiens tels que les  $\alpha$ -défensines, en plus de jouer un rôle de peptides antimicrobiens, ont un rôle important dans la régulation du microbiote intestinal au niveau de l'intestin grêle (Sankaran-Walters et al., 2017).

### c. Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes, aussi nommées « Goblet cells », sont des cellules à mucus présentes dans les cryptes et les villosités intestinales. Leur nombre augmente selon un gradient « duodénum - colon ». Ce sont les cellules majoritaires pour la sécrétion du mucus intestinal, permettant ainsi la protection et la lubrification de la BEI (McCauley and Guasch, 2015).

Les cellules caliciformes produisent le mucus de façon différente selon leur emplacement dans le tube digestif. Dans l'intestin grêle, une seule couche de mucus pénétrable par les bactéries intestinales est présente. Elle permet de protéger l'épithélium par des médiateurs antibactériens. Dans le colon, deux couches de mucus sont présentes : une couche externe facilement pénétrable par les bactéries qui sert d'habitat aux bactéries commensales et lubrifie le tube digestif pour le passage des selles, et une couche interne proche de l'épithélium qui le protège et est imperméable aux bactéries (Figure 6) (Johansson and Hansson, 2016). Le mucus intestinal est constitué majoritairement de glycoprotéines appelées mucines, avec deux types principaux : les mucines transmembranaires et les « gel-forming mucins ». La forme « gel-forming » est celle sécrétée par les cellules caliciformes.

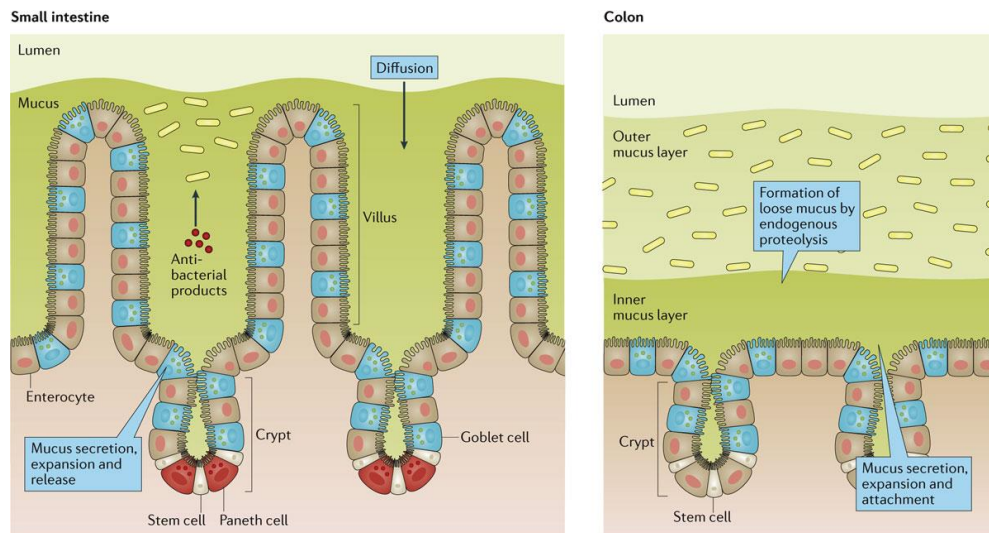


Figure 6 : Le mucus intestinal est différent selon la localisation dans le tube digestif.

Dans l'intestin grêle, une seule couche de mucus perméable aux bactéries est présente. Elle permet de protéger l'épithélium contre les bactéries et le bolus alimentaire. Dans le colon, deux couches de mucus sont présentes, une perméable et une imperméable aux bactéries (Johansson and Hansson, 2016).

#### d. Les entérocytes

Les entérocytes sont le type cellulaire majoritaire dans l'épithélium intestinal. Présents tout le long du tube digestif, ils permettent le maintien de l'intégrité de la BEI par des processus de jonctions cellulaires importants. Ces cellules sont polarisées avec un pôle apical et un pôle basolatéral. Au niveau du pôle apical, elles possèdent des microvillosités leur donnant l'appellation de cellules avec bordure en brosse et permettant d'augmenter grandement la surface d'échange avec le lumen intestinal. A la surface membranaire apicale, les cellules possèdent des mucines transmembranaires formant ainsi le glycocalyx, une protection pour la cellule qui contient des enzymes pour faciliter la digestion et l'absorption des nutriments. Les entérocytes sont les cellules absorbantes de l'intestin, grâce à des phénomènes de perméabilité paracellulaire et transcellulaire (mécanismes abordés dans le paragraphe : La perméabilité intestinale) (Snoeck et al., 2005).

#### e. Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines sont l'une des plus petites populations de l'épithélium digestif, représentant moins de 1% de la population cellulaire. Elles sont présentes de l'estomac au colon descendant. Ces cellules produisent un large spectre d'hormones digestives ayant un rôle-clé dans la digestion, l'absorption des nutriments et la régulation de la satiété (Gribble and Reimann, 2019).

Il en existe de nombreux sous-types tels que les cellules entérochromaffines-like productrices d'histamine, les cellules G productrices de gastrine, les cellules D productrices de somatostatine (régulant la sécrétion d'acide gastrique), les cellules P/D1 productrices de Ghréline, les cellules L sécrétrices de GLP-1 (Glucagon-like peptide 1), les cellules I productrices de cholécystokinine (régulant la satiété), etc. (Gribble and Reimann, 2016). Néanmoins, la forme majoritaire reste les cellules entérochromaffines productrices de sérotonine (5-HT), un neurotransmetteur impliqué dans la motricité digestive et la fonction de barrière (Gribble and Reimann, 2016).

## f. Les cellules Tuft

Les cellules Tuft sont caractérisées par une morphologie cylindrique en touffe avec de longues microvillosités apicales, par un faisceau apical proéminent d'actine, villine et fibrine et de nombreuses vésicules apicales qui forment un système tubulo-vésiculaire (Trier et al., 1987). Elles représentent moins de 1% de la population cellulaire épithéliale. Ces cellules semblent impliquées dans la réponse immunitaire (Gerbe et al., 2016) et la chémodétection intestinale (Bezencon et al., 2007). Cependant la fonction précise des cellules Tuft n'est pas encore établie.

## g. Les cellules M

Les cellules M ou cellules Microfold sont des CEI responsables de la réponse immunitaire intestinale face aux bactéries et antigènes. Les cellules M sont associées aux follicules lymphoïdes épithéliaux et sont très actives dans les phénomènes de phagocytose et transcytose. L'ensemble de ces mécanismes permet l'absorption d'antigènes au niveau du lumen puis la production d'immunoglobulines par des lymphocytes B spécifiques des antigènes présentés (Ohno, 2016).

## 2. Structure formant la barrière épithéliale intestinale

La BEI doit protéger l'organisme en empêchant les pathogènes externes de rentrer mais doit également permettre l'absorption de nutriments, d'eau et d'électrolytes. Ces processus sont rendus possibles par la mise en place de jonctions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire.

### a. Interactions cellule-cellule

Les interactions entre cellules qui maintiennent l'intégrité de la BEI sont permises par quatre complexes : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes.

#### Les jonctions serrées

Les jonctions serrées (aussi nommées *zonula occludens*) sont des barrières ou pores sélectifs qui régulent la perméabilité paracellulaire (passage des ions, de l'eau et des macromolécules entre les cellules) (Figure 7). En plus de cette fonction de barrière, elles permettent aux cellules de se polariser et de maintenir la polarité, ainsi que de limiter la distribution des lipides baso-latéraux à la membrane apicale (Campbell et al., 2017). Elles sont composées de plus de 40 protéines transmembranaires ou cytoplasmiques se liant à l'actine, dont les Zonula Occludens (ZO), la cinguline, l'occludine, les claudines et les protéines Junctional Adhesion Molecule (JAM) (Figure 7). Plus récemment, deux nouvelles protéines ont été identifiées comme ayant un rôle dans le contrôle des jonctions serrées : les protéines MarvelD2 (alias tricelluline) et MarvelD3 qui sont associées à l'occludine pour permettre des jonctions entre trois cellules (Raleigh et al., 2010). Ces protéines de jonction sont associées au couple de protéines actine-myosine qui a la capacité de se contracter et de réguler la taille du pore.

#### Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes (aussi nommées *zonula adherens*) sont situées à un niveau plus basal que les jonctions serrées (Figure 7). Elles permettent une adhésion cellule-cellule selon une voie dépendante du calcium grâce à la E-cadhérine. La E-cadhérine permet l'adhésion des cellules entre elles *via* des interactions calcium dépendantes et est reliée par son domaine intracellulaire

aux protéines  $\beta$ -caténines par des complexes protéiques impliquant P120. Les protéines  $\alpha$ -caténines quant à elles se fixent sur les  $\beta$ -caténines pour permettre de maintenir le complexe protéique aux filaments d'actine. Ces jonctions adhérentes sont nécessaires pour le bon établissement des jonctions serrées entre cellules (Neunlist et al., 2012). Des protéines moins majeures pour la formation des jonctions adhérentes sont les nectines. Elles ne peuvent pas permettre un fort attachement cellule-cellule mais viennent en aide à la mise en place de la E-cadhérine en se fixant sur des protéines intracellulaires actine-adhérentes : les Afadines (Sato et al., 2011).

### Les desmosomes

Les desmosomes (aussi nommés *macula adherens*) sont situés en situation basale comparativement aux deux jonctions précédentes (Figure 7). Ce sont des complexes de protéines transmembranaires : les desmosomes cadhérines (nommées desmogleïne et desmocolline) permettent une adhésion forte cellule-cellule. Ces protéines sont reliées au cytosquelette *via* la desmoplakine intracellulaire permettant l'adhésion aux filaments intermédiaires de kératine de chaque cellule. Cette interaction cadhérine-desmoplakine est renforcée par des molécules de stabilisation : la plakophiline, la plakoglobine (Garrod and Chidgey, 2008).

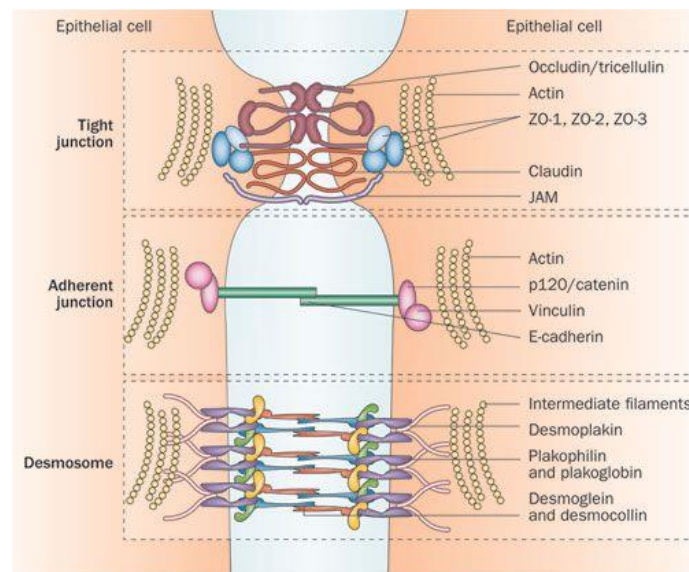


Figure 7 : Schéma récapitulatif des complexes de jonctions au sein de la barrière épithéliale intestinale.

Les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes sont trois complexes permettant l'adhésion cellule-cellule. Les jonctions serrées, le complexe le plus apical, permettent d'obtenir l'espace intercellulaire et de réguler la perméabilité paracellulaire de la barrière. Les jonctions adhérentes et desmosomes permettent davantage de maintenir l'adhésion entre les deux cellules et la cohésion de la barrière épithéliale intestinale (Neunlist et al., 2012).

### Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes (aussi nommées GAP junctions) permettent une communication cytoplasmique entre deux cellules adjacentes. Elles sont composées de canaux nommés les connexines qui s'associent en hexamère pour former un connexon (Figure 8). L'assemblage de deux connexons crée un pore communiquant entre les deux cellules permettant le passage des molécules de taille inférieure à 2-4 nm (Meşe et al., 2007)

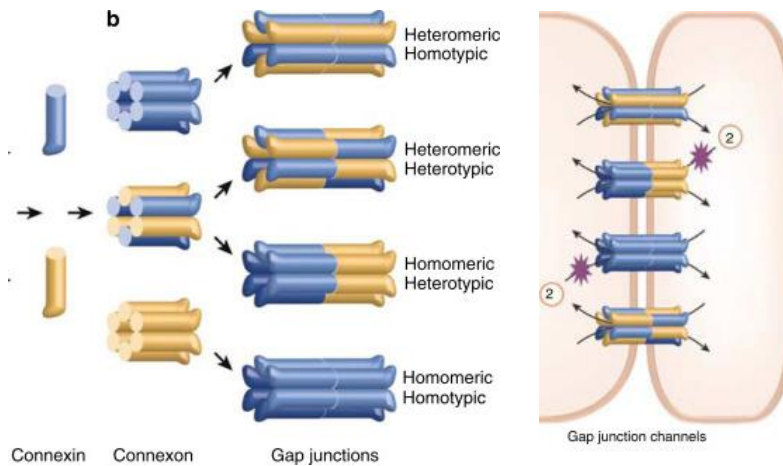


Figure 8 : L'assemblage d'un hétéro ou homohexamère de connexine forme un connexon.

Ces connexons peuvent s'assembler deux à deux pour former une jonction communicante permettant le passage d'ions, d'eau et de molécules de petite taille d'une cellule à une autre (Meşe et al., 2007).

### b. Interactions cellule-matrice

Afin d'assurer un maintien efficace de la BEI, une interaction cellule épithéliale–matrice extracellulaire est primordiale. Les CEI reposent sur une lame basale constituée d'éléments de la matrice extracellulaire tels que des laminines, des intégrines, du collagène de type IV, des fibronectines, etc. La matrice extracellulaire est principalement produite par le mésenchyme adjacent mais peut également être en partie produite par les CEI (Nikulin et al., 2018).

Les interactions cellule-matrice se font par des complexes unissant la matrice extracellulaire au cytosquelette cellulaire, nommés les adhésions focales (Figure 9). Ces complexes sont composés d'hétérodimères d' $\alpha$  et  $\beta$ -intégrines, des molécules transmembranaires, qui se lient à la lame basale. Les  $\beta$ -intégrines sont liées aux protéines talines, vinculines et paxilines. La protéine  $\alpha$ -actinine, une protéine du cytosquelette, peut se lier à la vinculine. En parallèle, après le recrutement de la Focal Adhesion Kinase (FAK) la paxiline est phosphorylée, et peut se lier aux filaments d'actine couplés à de la myosine. L'ensemble de ces interactions protéiques aboutit à un lien direct entre les anneaux d'actine-myosine et la matrice extracellulaire de la lame basale (Gumbiner, 1996). Par ailleurs, des protéines comme la Zyxin interviennent lorsque les contacts cellule-matrice sont matures et permettent de se lier à l' $\alpha$ -actinine et aux fibres de stress pour renforcer la structure. Une fois l'adhésion mature, les intégrines sont aussi capables d'interagir avec d'autres voies de signalisation impliquant la protéine kinase Src ou la protéine adaptatrice p130Cas (Mitra et al., 2005).

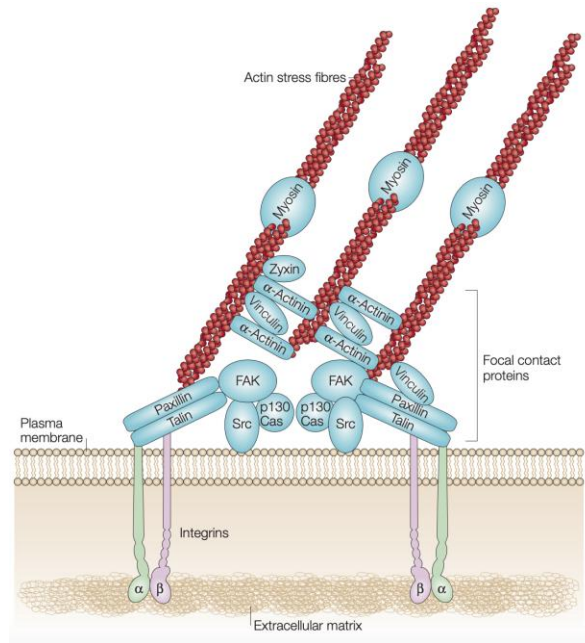


Figure 9 : Les adhésions focales permettent un attachement de la cellule via son cytosquelette à la matrice extracellulaire. Ces interactions mettent en jeu des protéines transmembranaires (les intégrines) et des complexes protéiques intracellulaires permettant un maintien fort du cytosquelette à la matrice (Mitra et al., 2005).

En plus des adhésions focales, les hémidesmosomes permettent une adhésion cellule-matrice. Seul l'hémidesmosome de type II est retrouvé au niveau des monocouches épithéliales tel que l'épithélium digestif. Ce complexe protéique est composé d'intégrines capables de se fixer à la laminine de la matrice extracellulaire. Ces intégrines cellulaires sont reliées aux filaments intermédiaires de kératine par de la plectine (Fontao et al., 1999). De plus, une particularité pour ces adhérences existe au niveau de l'intestin avec un gradient antéro-postérieur positif : l'association du complexe avec du collagène de type VII permet un meilleur ancrage dans la matrice extracellulaire (Stutzmann et al., 2000).

### 3. La perméabilité intestinale

La BEI, en plus d'assurer un rôle de barrière par son mucus excrété et ses jonctions serrées, régule la perméabilité intestinale. La perméabilité intestinale est le terme pour décrire le passage de molécules au travers de la paroi intestinale. Il existe deux grands types de perméabilité intestinale : la perméabilité paracellulaire et la perméabilité transcellulaire.

#### a. Perméabilité paracellulaire

La perméabilité paracellulaire est régulée par les jonctions serrées. Ces structures dynamiques contrôlent le passage d'ions, d'eau et de molécules. En plus d'être un filtre sélectif de par la taille des pores, la perméabilité paracellulaire ne permet qu'un passage selon la charge des protéines formant les jonctions. Au travers de ces jonctions, deux types de passage sont possibles : les passages sélectifs d'anions/cations par des pores « restrictifs » ou de molécules non chargées mais également le passage de macromolécules par des pores « non restrictifs ».



Le passage par les jonctions serrées entre deux cellules représente la majorité de la perméabilité paracellulaire. Elle permet le passage de molécules allant jusqu'à 4kDa et est sélective selon la charge. Cette sélectivité de la charge du canal peut se mettre en place selon les protéines constituant la jonction serrée. En effet il a été montré que selon le type de claudine constituant le canal, la sélectivité de charge peut différer : par exemple la claudine-2 permet le passage de cations tandis que la claudine-4 diminue le passage des cations (Colegio et al., 2003; Günzel and Yu, 2013; Van Itallie and Anderson, 2006; Weber et al., 2010). La modification des protéines constituant la jonction serrée peut influencer la perméabilité paracellulaire, et une modification de l'expression et/ou de la localisation de certaines protéines peut créer une perméabilité anormale. La taille quant à elle est régulée en partie par la contraction de l'anneau d'actine-myosine sur lequel la jonction serrée est ancrée. La Myosin Light Chain Kinase (MLCK) entraîne la phosphorylation de la Myosin Light Chain (MLC), ce qui aboutit à une contraction de l'anneau d'actine/myosine et donc à une ouverture de la jonction serrée augmentant la taille du pore (Blair et al., 2006; Clayburgh et al., 2004).

Cependant, le passage des macromolécules est également possible à la jonction de trois CEI. Ce type de jonction forme un pore grâce au complexe des protéines TAMP mettant en jeu l'occludine, les protéines Marvel2D (tricelluline) et Marvel3D. Des macromolécules allant jusqu'à un poids de 20 kDa peuvent passer par ce pore, mais cette voie de passage ne représente que 1% de la perméabilité paracellulaire (Krug et al., 2009).

### La perméabilité transcellulaire

La perméabilité transcellulaire est la conséquence de transports passifs et/ou actifs de molécules au travers des membranes apicales et baso-latérales des CEI. Cette perméabilité est possible par trois voies distinctes : le transport passif, le transport actif et le transport par endocytose/exocytose.

Le passage passif de molécules s'effectue selon un gradient de concentration entre les milieux extra- et intracellulaire et ne consomme aucune énergie. Il peut se faire par diffusion simple au travers de la membrane plasmique mais également par le biais de canaux (ex : canaux ioniques) pour atteindre un équilibre de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique (Jones et al., 2011; Reboul, 2013).

Le passage actif s'effectue contre le gradient de concentration et consomme de l'énergie produite par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) ou par la récupération du gradient électrochimique du passage d'une autre molécule (ex : symports transportant activement deux molécules dans le même sens). Le transport actif s'effectue par un transporteur spécifique à la molécule cible : par exemple SMCT-1 pour les acides gras à chaîne courte (AGCC), SGLT-1 pour le glucose, NPC1L1 pour le cholestérol ou vitamine E (Jones et al., 2011; Kaji et al., 2015; Yamanashi et al., 2017). Le transport actif peut aussi se faire par endocytose/exocytose, néanmoins environ 90% des protéines endocytées sont dégradées une fois libérées par exocytose au pôle baso-latéral et seulement 10% sont gardées sous leur forme intacte (Heyman et al., 1982).

### b. Facteurs de régulation de la perméabilité intestinale

La perméabilité intestinale peut être régulée par une multitude de molécules produites par l'hôte mais également par le microbiote intestinal. Les molécules impliquées comprennent des cytokines, des facteurs de croissance, des métabolites bactériens, des nutriments, etc.

#### Régulation par les cytokines et facteurs de croissance

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires peuvent induire des dysfonctions de la BEI suite à une inflammation ou à une pathologie et conduire à une augmentation de la perméabilité de la BEI. L'Interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) peut induire une redistribution des jonctions serrées avec une internalisation transmembranaire de certaines protéines constituant les jonctions (JAMA, occludine) augmentant ainsi la perméabilité (Bruewer et al., 2005). Le Tumor Necrosis Facteur  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) quant à lui diminue l'expression de ZO-1 (Ma et al., 2004), diminue celle de la claudine-2 (Günzel and Yu, 2013) ou encore augmente la phosphorylation de la MLC par la MLCK (Ma et al., 2005). L'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) modifie pour sa part l'expression de l'occludine et augmente l'expression de la MLCK aboutissant à une plus grande phosphorylation de la MLC (Al-Sadi et al., 2008).

A l'inverse, certaines cytokines ou facteurs de croissance peuvent être bénéfiques pour le renforcement de la barrière : l'IL-10 atténue les effets induits par l'IFN $\gamma$  (Madsen et al., 1997), l'IL-17 augmente l'expression des claudines-1 et -2 à l'inverse de l'IFN $\gamma$  (Kinugasa et al., 2000), le Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) augmente l'expression des claudines-1 et 4 et protège la barrière des effets de l'IFN $\gamma$  (Hering et al., 2011; Howe et al., 2005).

#### Régulation par des pathogènes ou dérivés bactériens

La perméabilité de la BEI peut être altérée par une infection avec des bactéries pathogènes ou des virus, mais peut également être influencée par des dérivés bactériens de la flore commensale. Les pathogènes comme l'*Escherichia Coli* ou l'*Helicobacter pylori* peuvent perturber la polarisation des CEI et de ce fait modifier le transport des protéines constituant les jonctions serrées (Roxas and Viswanathan, 2018). *Escherichia coli* produit également par des sécrétions des molécules capables d'augmenter la perméabilité en modifiant la taille des pores responsables de la perméabilité paracellulaire (Matsuzawa et al., 2005). D'autres, comme la *Salmonella*, utilisent la protéine claudine-2 pour promouvoir leur infection. De ce fait, la *Salmonella* augmente l'expression de la claudine-2 au niveau de la barrière, donnant lieu à une augmentation de la perméabilité (Zhang et al., 2013).

La flore commensale participe aussi à la régulation de la perméabilité notamment par la libération de métabolites bactériens. Par exemple le butyrate, un AGCC, permet d'augmenter l'assemblage des jonctions serrées au niveau apical des cellules et permet de diminuer la perméabilité paracellulaire (Peng et al., 2009). Les effets des AGCC et d'autres métabolites seront détaillés ultérieurement (voir Les médiateurs du microbiote intestinal).

#### Régulation de la perméabilité par des molécules pharmaceutiques

La perméabilité peut également être modulée par la prise de médicaments. Les antibiotiques sont les plus connus pour affecter la perméabilité intestinale, ils sont administrés généralement par voie

orale et sont en contact direct avec la BEI. Il a été montré que selon l'antibiotique ingéré les effets sur la perméabilité étaient différents : en effet l'ingestion de Metranidazole augmente fortement la perméabilité intestinale au FITC-dextran 4 kDa tandis que l'amoxicilline ou la vancomycine n'altèrent pas cette perméabilité. Ces mécanismes de modification de la perméabilité ne semblent cependant pas passer par une réorganisation de l'expression des protéines de jonctions serrées (Tulstrup et al., 2015). Si les antibiotiques sont combinés, ils peuvent induire une modification de l'expression des protéines de jonction avec notamment une diminution de ZO-1, d'occludine et de claudine-1 après quatorze jours de traitement (Feng et al., 2019).

#### 4. Réparation en cas de lésion

La BEI représente une première barrière de l'organisme contre un large spectre de molécules néfastes ou immunogènes provenant de la digestion, des bactéries ou des virus. La barrière peut être lésée ou abimée dans le cas de pathologies intestinales, et peut aboutir à l'augmentation de la pénétration et de l'absorption de facteurs pathogènes donnant lieu à une inflammation digestive. Pour parer à cela, des mécanismes de réparation de l'épithélium digestif se mettent en place rapidement pour conserver l'homéostasie intestinale. Ces phénomènes de réparation se font en trois phases (Figure 10) qui ne sont pas séquentielles mais s'entremêlent pendant le processus : restitution, prolifération et différenciation (Dignass, 2001).

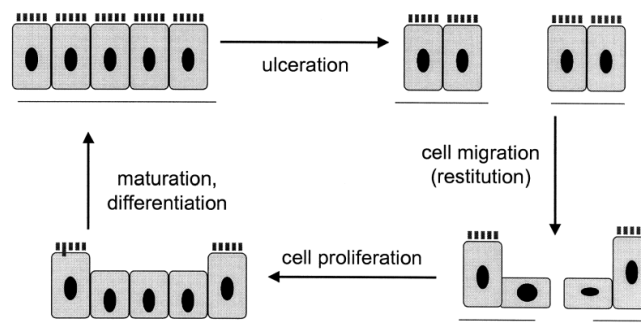


Figure 10 : Schéma récapitulatif des différentes phases de réparation de la barrière épithéliale intestinale en cas de lésion. (Sturm and Dignass, 2008).

La restitution est la première étape de la réparation de l'épithélium digestif. Elle se met en place dans un délai rapide après la lésion (de l'ordre de l'heure à quelques minutes), et est indépendante de la prolifération cellulaire. Elle consiste à rapidement obturer la discontinuité cellulaire dans la BEI due à la lésion. Les cellules adjacentes migrent vers la zone lésée et s'étalent en réorganisant leur cytosquelette pour rétablir une continuité cellulaire (Lacy, 1988; Sturm and Dignass, 2008). Cette restitution est modulée par plusieurs voies de signalisation comme la voie du TGF $\beta$  (Dignass and Podolsky, 1993) ou celle des Trefoil Factors (Dignass et al., 1994; Taupin and Podolsky, 2003).

Dans un second temps vient l'étape de prolifération, nécessaire pour remplacer les cellules perdues lors de la lésion. Ce sont des cellules provenant des cryptes qui migrent au niveau de la zone lésée.

En dernier lieu vient la maturation et la différenciation cellulaire qui permet de restaurer les types cellulaires spécifiques perdus lors de la lésion, et ainsi d'assurer la fonction de barrière de

l'épithélium digestif (Taupin and Podolsky, 2003). Ces étapes de réparation de la BEI peuvent également être influencées par des métabolites bactériens provenant du microbiote intestinal comme les sels biliaires secondaires ou les AGCC (Han et al., 2015; Mroz et al., 2018).

### C. Fonctions immunitaires de la BEI

La BEI joue un rôle-clé dans l'immunité du tube digestif. La BEI possède une fonction immunitaire innée qui se fait principalement grâce au mucus. Le mucus est une barrière physique, qui permet de protéger les CEI contre les pathogènes, constituée principalement de mucine et contient des peptides antimicrobiens (AMPs) (Perez-Lopez et al., 2016). Les CEI ont des récepteurs PRR (Pattern recognition receptor, dont fait partie la famille des Toll-Like Receptor (TLR)) qui sont capables de reconnaître les pathogènes par leurs protéines PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns) ou MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns). Lors d'un contact avec ces PRR, les CEI sont capables de rapidement produire et relâcher des mucines, défensines, cytokines inflammatoires et des AMPs (Dieterich et al., 2018; Lievin-Le Moal and Servin, 2006). Parmi ces peptides se trouvent les défensines : ces protéines ont des qualités antiparasitaires, antivirales et antibactériennes (Ostaff et al., 2013) permettant une régulation de la croissance microbienne ainsi qu'une moins grande résistance des pathogènes aux réponses du système immunitaire inné. En parallèle, l'activation des PRR active des voies de signalisation permettant la synthèse de cytokines nécessaires à la réponse inflammatoire et au recrutement des cellules immunitaires innées (Fukata and Arditi, 2013).

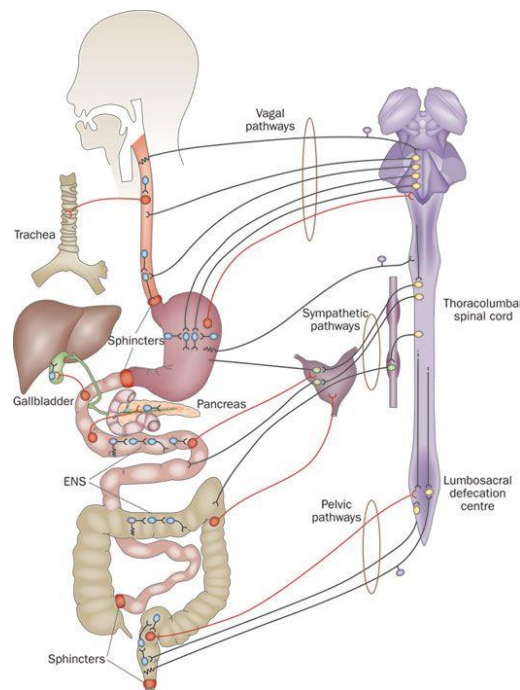
Les CEI sont capables de prélever des antigènes provenant des bactéries intestinales ou de la nourriture et de les présenter aux cellules immunitaires présentes sous l'épithélium (Ménard et al., 2010). Cependant, il est montré qu'après endocytose, les vésicules fusionnent avec un endosome et une partie des protéines seront dégradées. Il faut donc noter que les antigènes endocytés ne sont pas présentés en intégralité aux cellules immunitaires. Ce mécanisme permet la présentation d'antigènes bactériens ou alimentaires aux cellules dendritiques présentes dans la lamina propria (Mallegol et al., 2007). Il existe en plus de cela une transcytose de bactéries entières ou partielles par les cellules M et calciformes permettant une présentation directe de la bactérie aux cellules présentatrices d'antigènes au niveau des plaques de Peyer (Beloqui et al., 2017). Cette présentation antigénique aux cellules dendritiques est un élément-clé dans les mécanismes de relargage d'immunoglobulines A au niveau de la lumière intestinale, les immunoglobulines A agissant comme un AMPs. Ces mécanismes permettent également le recrutement des macrophages présents sous la monocouche épithéliale (Bain and Schridde, 2018).

De façon complémentaire, ces phénomènes de présentation antigénique activent le système immunitaire adaptatif : les cellules dendritiques recrutent et activent les lymphocytes qui produiront en conséquence les anticorps adaptés (Soderholm and Pedicord, 2019). Renforçant ce mécanisme, les CEI sont capables de sécréter des molécules inflammatoires telles que l'IL-15 qui permet le recrutement des lymphocytes T intraépithéliaux (Hu et al., 2018), ou de la 5-HT, produite par les cellules entérochromaffines, pour activer des cellules T ou des cellules éosinophiles (Kang et al., 2013a; Leon-Ponte, et al., 2007).

#### D. Régulation des grandes fonctions digestives par le système nerveux

Les grandes fonctions digestives sont régulées à l’instar des autres grandes fonctions du corps humain par les afflux nerveux centraux et périphériques. Mais contrairement aux autres fonctions du corps, les fonctions digestives sont également soumises et régulées par un autre système nerveux : le SNE.

Malgré le fait que le SNE soit considéré comme autonome, il est sous l’influence directe du SNC. Il existe deux voies majoritaires de communication SNC-SNE : la voie sympathique (mésentérique et coeliaque) et la voie parasympathique (vagale et sacrée/pelvienne) (Figure 11). Par ailleurs la communication n’est cependant pas unilatérale, le SNE est capable de projeter vers des éléments du SNC comme par exemple les noyaux dorsaux pour gérer les phénomènes de réflexes (Furness, 2012).



**Figure 11 : L’innervation du tractus gastro-intestinal.**

*L’innervation extrinsèque du tube digestif se fait par deux voies majoritaires (noir) : la voie sympathique et la voie parasympathique (vagale et pelvienne). L’innervation intrinsèque est assurée par le système nerveux entérique qui est également capable de projeter vers le système nerveux central ou les organes secondaires du tractus digestif (rouge) (Furness, 2012).*

##### a. Rôle dans les fonctions digestives

Le tube digestif reçoit donc trois grands types d’innervation : le système parasympathique, le système sympathique et le SNE. L’innervation extrinsèque du tube digestif innerve principalement les ganglions et par leur action sur le SNE, elle peut moduler les fonctions digestives.

Ces communications à double sens entre SNE et SNC permettent de moduler les fonctions digestives, mais aussi de relier les centres émotionnels et cognitifs du cerveau aux fonctions et mécanismes intestinaux périphériques. Elles gèrent les sensations physiologiques non douloureuses (nausée, satiété, distension du tube digestif) par le biais de mécanorécepteurs

(Berthoud and Neuhuber, 2000). De plus, ces communications suffisent pour avoir une forte influence sur la motricité et sur d'autres systèmes effecteurs comme la région de l'estomac ou le colon terminal. Cela aboutit à un contrôle fin de la motricité par des phénomènes d'inhibition/excitation (Hopkins et al., 1996).

En plus de gérer la motricité, les afférences du système nerveux périphérique permettent de réguler la perméabilité intestinale en la diminuant suite à une brûlure, phénomène passant par l'activation des cellules gliales entériques (CGE) (Costantini et al., 2010). La stimulation de l'efférence vagale est capable de diminuer les phénomènes de colite dans un modèle murin traité au dextran sulfate sodium. Effectivement suite à une vagotomie, l'inflammation de la BEI apparaît beaucoup plus précocement dans ce modèle d'inflammation (Ghia et al., 2007). La stimulation des nerfs sacrés utilisée comme traitement de nos jours permet également de réguler la perméabilité intestinale, la réparation de la muqueuse et les phénomènes inflammatoires (Brégeon et al., 2016), ou encore de parer à l'incontinence fécale (Brochard et al., 2019).

Les interactions directes entre le SNC et le SNE *via* ces voies nerveuses ont été suggérées comme impliquées dans des pathologies centrales telles que la maladie de Parkinson. Selon l'hypothèse de Braak, la maladie de Parkinson débiterait par des agrégats protéiques induisant une inflammation au niveau du SNE, et se propagerait jusqu'au cerveau *via* le nerf vague (Klingelhoefer and Reichmann, 2015; Prigent et al., 2019). Cependant cette théorie reste encore discutée à l'heure actuelle.

## Le système nerveux entérique

### I. Généralités

Le système nerveux entérique (SNE), aussi dénommé « le second cerveau » (Gershon, 1998) peut être considéré comme le système nerveux originel puisque certains organismes primordiaux ne possèdent pas d'encéphale mais possèdent déjà une innervation au sein du tube digestif. L'identification du SNE commence au 19<sup>e</sup> siècle avec l'identification de deux plexus majeurs par G. Meissner et L. Auerbach qui donneront leurs noms aux plexus identifiés : le plexus de Meissner (ou sous-muqueux) (Meissner, 1857) et le plexus d'Auerbach (ou myentérique) (Auerbach, 1864). Par la suite dans les années 1890, Santiago Ramon y Cajal identifia différents types de neurones au niveau de la paroi intestinale qui furent classifiés selon leur architecture et morphologie par A.S. Dogiel (Cajal, 1893; Dogiel, 1899; Hansen, 2003). Par la suite Bayliss et Starling ont mis en évidence les réflexes de péristaltisme du tube digestif. Ils ont montré que les contractions digestives sont dépendantes de stimulations mécaniques du tube digestif mais également contrôlées par le plexus d'Auerbach, de façon indépendante du SNC. Ils ont aussi démontré qu'une fois le système nerveux local paralysé par de la nicotine ou de la cocaïne, aucune contraction n'était observée. Ils ont ainsi découvert le rôle du SNE (Bayliss and Starling, 1899). Il fallut attendre quelques années pour voir apparaître la notion de système nerveux indépendant pour le SNE. Cela fut démontré par Trendelenburg qui montra que le réflexe péristaltique pouvait être observé suite à des stimulations *in vitro* d'un organe isolé de cochon d'Inde (Trendelenburg, 1917). La notion d'indépendance du SNE fut définitivement reconnue grâce aux travaux de J.N

Langley qui montra que le SNE était une des branches du système nerveux autonome, faisant apparaître le SNE aux côtés du système nerveux sympathique et parasympathique (Langley, 1921).

### II. Organisation

Le SNE s'étend tout le long du tube digestif, du tiers inférieur de l'œsophage au rectum, où il constitue un réseau en maillage entourant l'intégralité du tube digestif. Il est constitué de ganglions entériques interconnectés par des fibres interganglionnaires (Costa et al., 2000). Le SNE est organisé en deux plexus majeurs comme expliqué précédemment (Figure 12) :

- Le plexus myentérique (ou d'Auerbach) : situé entre les deux couches de cellules musculaires lisses circulaires et longitudinales. Ce plexus a pour fonction principale de réguler les fonctions motrices intestinales (Schemann and Neunlist, 2004).
- Le plexus sous-muqueux : situé entre la muqueuse et la couche de cellules musculaires lisses circulaires. Il n'est présent que dans le colon et l'intestin grêle, et peut être subdivisé en trois plexus chez l'Homme : le plexus sous-muqueux interne (Meissner) en contact avec la muqueuse, le plexus sous-muqueux externe (Schabadasch ou Henle) en contact avec le muscle lisse circulaire, et un plexus intermédiaire situé entre les deux précédents (Hoyle and Burnstock, 1989; Schemann and Neunlist, 2004). Par simplicité, l'ensemble de ces plexus seront décrits sous la dénomination de « plexus sous-muqueux ». Ce plexus sous-muqueux a pour fonction principale de réguler les fonctions de la muqueuse intestinale (Wood et al., 1999).

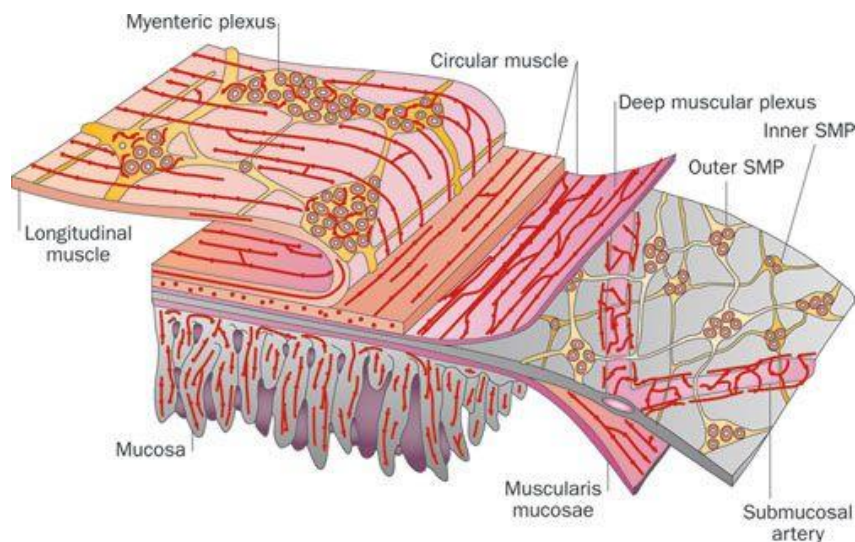


Figure 12 : **Organisation du système nerveux entérique.**

*Le système nerveux entérique est composé de deux plexus principaux : le plexus myentérique localisé entre les deux couches musculaires et le plexus sous-muqueux localisé entre la muqueuse et la couche musculaire circulaire (Furness, 2012).*

Le système nerveux entérique est organisé en ganglions entériques constitués de neurones entériques et de CGE. Chez l'Homme, le SNE est composé de 400 à 600 millions de neurones, l'équivalent du nombre de neurones présent au sein de la moelle épinière (Furness, 2006). Les CGE font également partie intégrante du SNE.

A. Les neurones entériques

1. Les classifications des neurones entériques

Le SNE est constitué de différents types de neurones, qui au cours des années, ont été classés selon plusieurs critères : leurs structures ou morphologies, leurs propriétés électrophysiologiques et leurs fonctions.

La première classification en trois types a été réalisée par A.S. Dogiel (Dogiel, 1899) sur la base de la morphologie du neurone, la longueur et la forme de ses prolongements. Le type I possède un axone et plusieurs dendrites courtes, le type II possède un ou plusieurs axones (neurones pseudo-unipolaires), le type III possède un axone avec un embranchement dendritique bien développé (Figure 13). Il fallut attendre les années 1980 pour la découverte des autres sous-types de Dogiel allant du type IV à VII (Brehmer et al., 1999; Furness, 2006; Timmermans et al., 1997). Il faut cependant noter que les formes majoritaires sont les neurones Dogiel de types I à III.

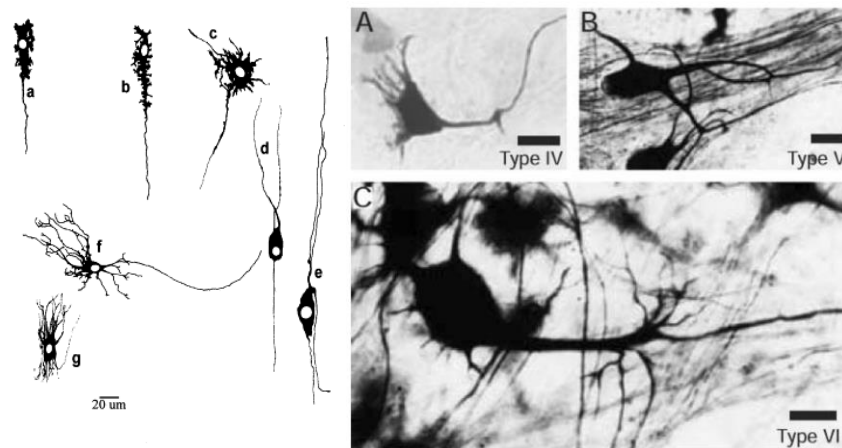


Figure 13 : Classification des différents types Dogiel de neurones.

(Gauche) a-c : neurones Dogiel de type I, avec un seul axone et de nombreuses dendrites courtes ; d-e : neurones Dogiel de type II, avec plusieurs axones (pseudo-unipolaires) ; f-g : neurones Dogiel de type III, avec un seul axone et de longues dendrites. (Droite) A : neurones Dogiel de type IV, avec un seul axone et des dendrites semi-longues d'un seul côté du neurone ; B : neurones Dogiel de type V, avec un seul axone et de longues dendrites émergeant de l'axone ; C : neurones Dogiel de type VI, avec un seul axone et de fines dendrites émergeant du corps cellulaire et de la partie proximale de l'axone (Furness, 2006).

Les neurones entériques sont aussi classifiés selon leurs propriétés électrophysiologiques. Il en existe deux à trois types selon le plexus concerné. Dans le plexus myentérique sont retrouvés les neurones aux propriétés électrophysiologiques S (pour « Synaptic input ») caractérisés par un potentiel post-synaptique rapide et une phase d'hyperpolarisation courte, et les neurones à large phase d'hyperpolarisation AH (« large After Hyperpolarization ») après un potentiel d'action (Carbone et al., 2014; Hirst et al., 1974). Les neurones S ont une morphologie Dogiel de type I ou III tandis que les neurones de classe AH ont une morphologie Dogiel de type II. Une troisième classe de neurone a été découverte dans le plexus sous-muqueux : un neurone au seuil d'excitation bas LT (« Low-Threshold ») capable de générer spontanément des potentiels d'action sans stimulation (Lomax et al., 2001).

Une dernière classification des neurones entériques selon leur fonction a été mise en place chez l'Homme. Elle est basée sur leurs rôles dans le maintien des fonctions digestives, l'expression de



neurotransmetteurs et de récepteurs : les neurones sensoriels (ou neurones afférents primaires), les interneurones et les neurones moteurs (Brehmer, 2006).

### 2. Les différents types de neurones

#### a. Les neurones sensoriels

Les neurones sensoriels ou neurones primaires afférents représentent 20% des neurones entériques chez le cochon d'Inde. Ils sont capables de transduire et encoder l'information de l'environnement chimique et physique du tissu qu'ils innervent pour engager une réponse adéquate. Il existe deux sous-types de neurones primaires afférents : les neurones extrinsèques et les neurones intrinsèques ou IPANs (« Intrinsic Primary Afferent Neurons ») (Furness et al., 2004). Les neurones primaires afférents sont des neurones Dogiel de type II et de classe AH (Furness et al., 1998). Les IPANs communiquent avec les autres neurones en sécrétant de l'acétylcholine (Ach), de la calbindine, tachykinine, etc (Furness, 2000).

Les IPANs présents au niveau de la paroi intestinale permettent de capter des signaux pour initier des réflexes essentiels dans le contrôle des fonctions digestives comme les réflexes de motricité, de sécrétomotricité et de vasomotricité (Furness et al., 2004). Ils ne sont pas tous sensibles aux mêmes stimuli. En effet, certains sont chemosensitifs répondant à un stimulus chimique comme par exemple la présence d'AGCC à la surface de la muqueuse, activant ainsi les IPANs du plexus myentérique et du plexus sous-muqueux (Bertrand et al., 1997). D'autres sont sensibles aux stimuli mécaniques au niveau de la muqueuse permettant ainsi une activation des IPANs au niveau du plexus sous-muqueux projetant sur le plexus myentérique (Kirchgessner et al., 1992). Ce mécanisme d'activation est médié par la libération de 5-HT par les cellules entérochromaffines présentes dans la muqueuse intestinale (Pan and Gershon, 2000). A l'opposé, d'autres IPANs sensibles à la distension ou à l'étirement de la paroi intestinale sont uniquement présents dans le plexus myentérique (Kunze et al., 2000).

#### b. Les interneurones

Les interneurones sont impliqués dans les phénomènes de réflexes locaux de la motricité, mais certains peuvent aussi jouer un rôle mécano-senseur lors d'un étirement de la paroi digestive (Smith et al., 2007b). Il existe deux catégories d'interneurones dans le tube digestif : les interneurones ascendants (dirigés vers la bouche) et les interneurones descendants (dirigés vers l'anus), ainsi que différents sous-types parmi ces deux catégories. Cependant, le nombre de sous-types semble différer selon la localisation dans le tube digestif : certaines études montrant un seul sous-type ascendant dans l'intestin grêle (Costa et al., 2000) contre trois sous-types dans le colon distal (Lomax et al., 2001). Chez le cochon d'Inde, les interneurones ascendants sont des neurones Dogiel de type I et de classe S tandis que les descendants sont majoritairement de morphologie Dogiel de type II et de classe S ou AH (Brookes, 2001).

Les interneurones ascendants communiquent avec les autres neurones en sécrétant de l'Ach, de la calrétinine mais aussi de la substance P. Cependant, la communication se fait majoritairement *via* la sécrétion d'Ach. (Bornstein et al., 2004). A l'opposé, les neurones descendants possèdent trois différents sous-types classés selon leur codage neurochimique et leurs fonctions. Il existe les interneurones descendants à Choline Acétyl-Transférase (ChAT)/Nitric Oxyde Synthase

(NOS)/Vaso-Intestinal Peptide (VIP) recevant des informations par les neurones sensoriels locaux, les interneurons descendants ChAT/Somatostatine et les interneurons descendants ChAT/5-HT (Brookes, 2001). Les neurones ChAT/NOS/VIP sont impliqués dans les réflexes de motricité locaux, les interneurons ChAT/Somatostatine sont impliqués dans la conduction des complexes migratoires myoélectriques pour la motricité de repos et les interneurons ChAT/5-HT sont impliqués dans les réflexes sécrétomoteurs (Furness, 2000).

### c. Les neurones moteurs

Il existe cinq sous-catégories de neurones moteurs chez l'Homme : les neurones excitateurs ou inhibiteurs du muscle intestinal, les neurones sécrétomoteurs vasodilatateurs, les neurones sécrétomoteurs non-vasodilatateurs et les neurones innervant les cellules entéroendocrines. Les neurones moteurs sont majoritairement de morphologie Dogiel de type I et de classe S (Brehmer, 2006).

Les neurones excitateurs ou inhibiteurs agissent principalement sur leur cible (muscle, vaisseaux, épithélium, etc.) par la sécrétion de neurotransmetteurs. Les neurones excitateurs du muscle sont principalement de deux types : cholinergique et tachykinergique (substance P et neurokinine A) alors que les neurones inhibiteurs produisent du NO (Nitric Oxyde), du VIP, de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), de l'ATP, du neuropeptide Y ou encore du monoxyde de carbone (Hansen, 2003). Les neurones sécrétomoteurs/vasodilatateurs régulent la sécrétion d'eau, d'électrolytes et le flux sanguin. Ils possèdent un corps cellulaire dans le plexus sous-muqueux avec des prolongements dans la muqueuse ou vers le plexus myentérique. Ils peuvent être de deux types : cholinergiques ou non cholinergiques utilisant le VIP. Les neurones sécrétomoteurs non vasodilatateurs innervent principalement la muqueuse et agissent par le biais de l'Ach ou du neuropeptide Y (Furness et al., 2003). Les neurones innervant les cellules entéroendocrines sont connus pour gérer la sécrétion de gastrine par l'innervation de la muqueuse gastrique (Hansen, 2003).

### 3. Marqueurs neuronaux entériques

Les marqueurs des neurones entériques ne sont pas spécifiques au SNE, ce sont les mêmes que ceux utilisés pour les neurones du système périphérique et central. Les marqueurs pan-neuronaux les plus couramment utilisés ainsi que leurs localisations sont résumés dans le Tableau 1.

Nom du marqueur	Localisation de la protéine	Exemple de citation
Hu C/D	Corps cellulaire et noyau	(Boesmans et al., 2019)
Neuronal Specific Enolase (NSE)	Corps cellulaire et prolongements	(Dothel et al., 2015)
Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5)	Corps cellulaire et prolongements	(Neunlist and Schemann, 2014)
NeuroFilaments 200 (NF-200)	Corps cellulaire et prolongements	(Pouclet et al., 2012)
Tubuline $\beta$ -III (Tub- $\beta$ III ou Tuj-1)	Corps cellulaire et prolongements	(Duchalais et al., 2018)
Microtubule-Associated Protein-2 (MAP-2)	Corps cellulaire et prolongements	(Lin et al., 2002)
Synapsine-1 (Syn-1)	Terminaisons synaptiques	(Le Berre-Scoul et al., 2017)

Tableau 1 : Marqueurs des neurones entériques et leur localisation cellulaire.

Il existe bien évidemment des marqueurs de neurotransmetteurs identiques aux neurones centraux ou périphériques tels que ChAT, VIP ou encore NOS (Foong et al., 2015; Humenick et al., 2019), mais ces marqueurs ciblent des sous-types spécifiques de neurones selon leurs codages neurochimiques.

Hu C/D est une protéine se liant à l'ARNm et jouant un rôle de régulateur de transcription des ARNm. Ses rôles les plus établis sont ceux concernant la neurogénèse, mais aussi la survie neuronale, la plasticité synaptique pendant les mécanismes d'apprentissage et son rôle lors de lésions. Un marquage Hu C/D marque le corps cellulaire (Figure 14) et non les prolongements neuronaux (neurites et axone) (Li et al., 2016a). Il est particulièrement utilisé en montage de tissu entier (whole-mount) grâce à un fort marquage des corps cellulaires permettant un comptage neuronal plus aisé (Lin et al., 2002).

NSE et PGP9.5 reconnaissent quant à eux les corps cellulaires neuronaux mais également leurs prolongements (Figure 14). NSE est une enzyme de la glycolyse exprimée spécifiquement dans les neurones. PGP9.5 joue un rôle dans l'hydrolyse de l'ubiquitine, d'où son autre nom d'enzyme hydrolase spécifique de l'ubiquitine en carboxy-terminal.

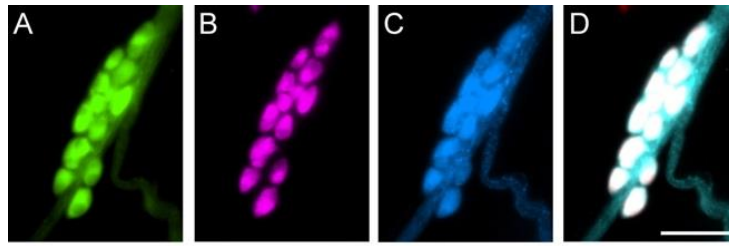


Figure 14 : *Marquage immunohistochimique d'un plexus sous-muqueux de colon humain par des marqueurs pan-neuronaux. A : marquage NSE (vert) localisé au niveau des prolongements et corps cellulaires ; B : marquage HuC/D (magenta) localisé uniquement au niveau des corps cellulaires ; C : marquage PGP9.5 (bleu) localisé au niveau des prolongements et corps cellulaires ; D : Superposition des trois marquages A,B et C, échelle de 100  $\mu$ m (Hoff et al., 2008).*

Les protéines NF-200, Tub- $\beta$ III et MAP-2 sont des protéines du cytosquelette neuronal exclusivement. Parmi ces trois marqueurs, la Tub- $\beta$ III est la plus utilisée pour les marquages des prolongements entériques. Cependant, tous les neurones n'expriment pas ces marqueurs, en effet il semblerait que seule une partie des neurones MAP-2 expriment le marqueur NF-200, tandis que tous les neurones exprimant NF-200 expriment MAP-2 (Lin et al., 2002). Cette variation est également espèce dépendante puisque chez le cochon d'Inde la quasi-totalité des neurones entériques expriment MAP-2, tandis que chez l'Homme seule une proportion de 10% des cellules Hu C/D<sup>+</sup> l'expriment (Tam, 1990).

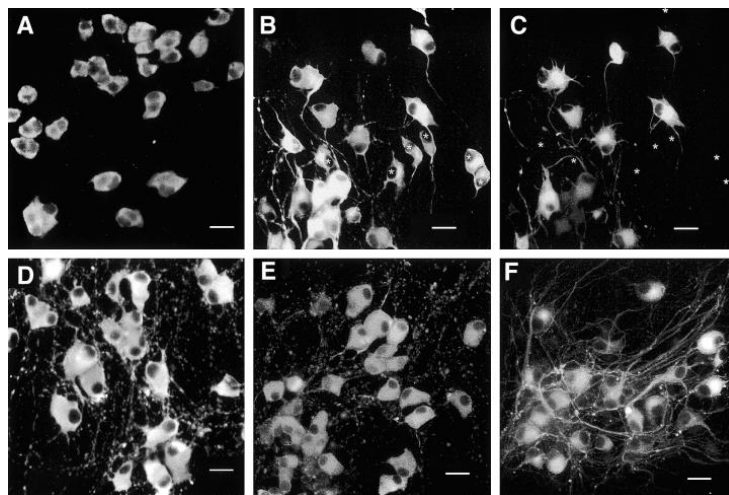


Figure 15 : *Immunomarquage de ganglions myentériques in vitro avec des marqueurs neuronaux. A : marquage Hu localisé au niveau des noyaux et du cytoplasme des corps cellulaires ; B : marquage MAP-2 localisé au niveau du cytoplasme et des prolongements neuronaux ; C : marquage NF-200 localisé au niveau du cytoplasme et des prolongements neuronaux. Le champ est identique à la photographie b, et montre que seule une partie des neurones MAP-2<sup>+</sup> présente un marquage NF-200 ; D : marquage NSE localisé au niveau du cytoplasme et des prolongements neuronaux ; E : marquage PGP9.5 localisé au niveau du cytoplasme et des prolongements neuronaux ; F : marquage Tub- $\beta$ III localisé au niveau du cytoplasme et des prolongements cellulaires (Lin et al., 2002).*

### B. Les cellules gliales entériques

Outre les neurones entériques, le SNE est composé de CGE. Les CGE ont été identifiées très précocement par Dogiel en 1899 comme des cellules satellites des neurones entériques (Dogiel, 1899) puis seront ensuite associées à des cellules de Schwann. Ce n'est que plus tard que ces cellules seront identifiées comme un type distinct de glie (Gabella, 1972) présent au niveau des ganglions entériques dans les plexus nerveux mais également le long des fibres nerveuses. Du fait de leur morphologie, elles sont maintenant assimilées à des cellules astrocyte-like (Jessen and Mirsky, 1983) avec une morphologie unique possédant de longues excroissances qui s'étendent

jusqu'aux neurones et recouvrent leurs prolongements, permettant ainsi de les distinguer des cellules de Schwann (Gabella, 1981). Ces cellules possèdent un trait caractéristique : des filaments de 10 nm denses permettant un ancrage fort sur les ganglions (Rühl, 2005). Il faut cependant noter que ces cellules sont deux à trois fois plus nombreuses que les neurones entériques dans le SNE selon les espèces (Coelho-Aguiar et al., 2015; Gabella and Trigg, 1984). Elles ont été historiquement assimilées, tout comme les cellules gliales du SNC, à des cellules de soutien permettant au SNE un soutien et un rôle nutritif (Figure 16). Cependant durant les dernières années, leurs rôles importants pour le maintien des fonctions digestives ont été de plus en plus mis en lumière.

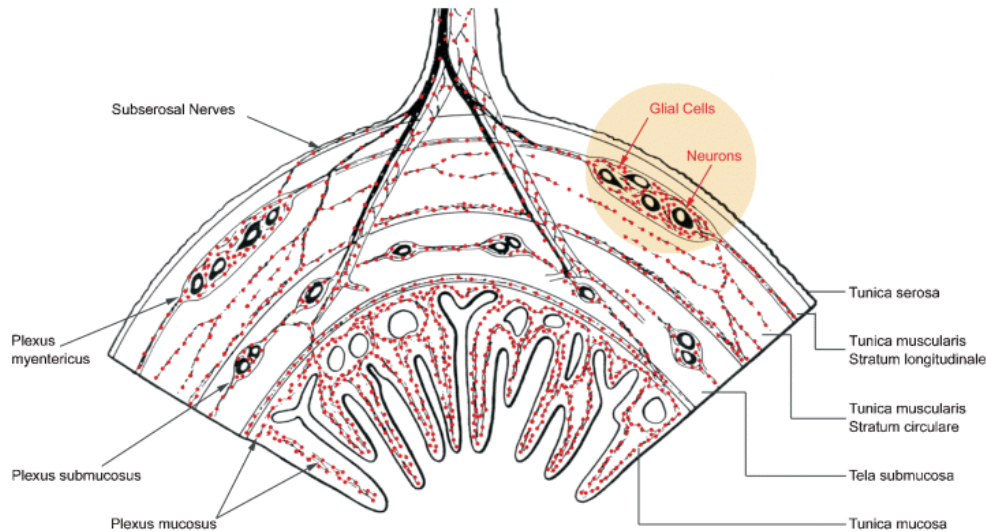


Figure 16 : Coupe schématique d'un intestin avec localisation des cellules gliales entériques.

La glie entérique (symbolisée par des points rouges) forme un réseau développé et important à travers toutes les couches de la paroi intestinale, de la muqueuse à la séreuse (Rühl, 2005).

### 1. Les différents types de glie entérique

Une première classification des CGE a été mise en place, divisant les CGE en deux sous-types : le type-I aussi nommé protoplasmique représentant les cellules présentes dans les ganglions myentériques, et le type-II ou fibreux présent au niveau des fibres inter-ganglionnaires (Hanani and Reichenbach, 1994). Cette classification était très similaire à celle initialement décrite pour les astrocytes du SNC (Andriezen, 1893).

Actuellement, les CGE sont divisées en quatre sous-catégories selon leur localisation dans les plexus ou dans les couches externes au plexus du tube digestif. Il est à noter que tous les types de CGE partagent les mêmes marqueurs et ne peuvent être distingués par l'expression d'un marqueur spécifique. L'ensemble de ces CGE semble provenir d'une origine commune qui se différencie en fonction de la localisation finale et du contexte physiologique en l'un des quatre sous-types de glie entérique (Figure 17) (Boesmans et al., 2015; Gulbransen and Sharkey, 2012).

- Le type-I est intra-ganglionnaire, restreint au plexus myentérique et sous-muqueux, et possède de nombreux prolongements courts et irréguliers avec un corps cellulaire volumineux. Ce sont les cellules considérées comme astrocyte-like et précédemment identifiées par Hanani et Reichenbach comme le type-I. Ces cellules sont GFAP<sup>+</sup>/S100B<sup>+</sup> de façon majoritaire.

- Le type-II a été pré-décrit comme le type fibreux par cette même équipe. Il est présent au niveau des fibres inter-ganglionnaires ou en périphérie proche. Les prolongements de ces CGE sont longs et proviennent majoritairement d'un côté de la cellule. Ces CGE sont en contact direct avec les fibres nerveuses mais ne les entourent pas comme des cellules de Schwann. Ces cellules sont GFAP<sup>+</sup>/S100B<sup>+</sup> de façon majoritaire.
- Le type-III possède un corps cellulaire présent au niveau des plexus mais qui n'est pas au contact des ganglions ou fibres inter-ganglionnaires. De plus, ces cellules peuvent avoir un corps cellulaire au niveau de la lamina propria. Ce type-III est subdivisé en deux catégories : les types-III de la muqueuse et les types-III des plexus entériques. Ces CGE sont caractérisées par quatre prolongements majeurs avec de longs prolongements secondaires et forment une matrice dans la partie extra-ganglionnaire, tout en contactant du bout de leurs prolongements les fibres nerveuses. Ce type de CGE entoure aussi les petits vaisseaux sanguins. Ces cellules sont GFAP<sup>+</sup>/S100B<sup>+</sup> de façon majoritaire.
- Le type-IV possède une morphologie bipolaire, très allongée et est présent au niveau des couches musculaires lisses.

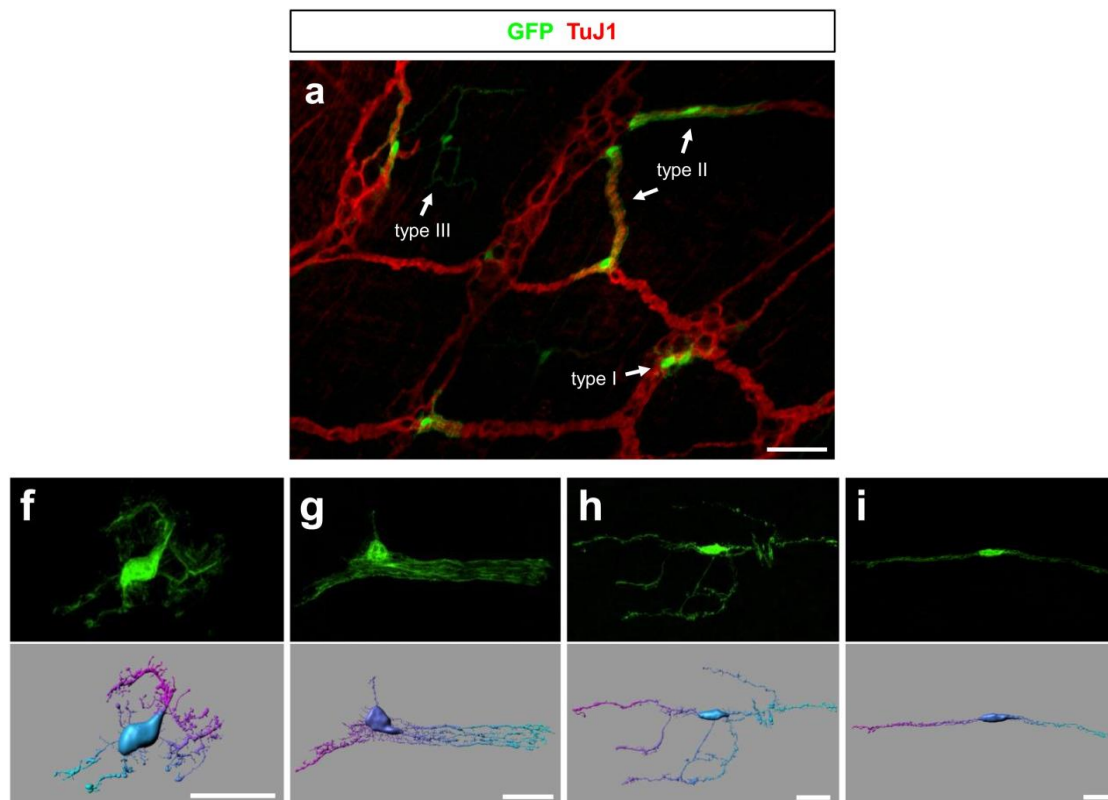


Figure 17 : Marquage unitaire de cellules gliales entériques dans le plexus myentérique murin.

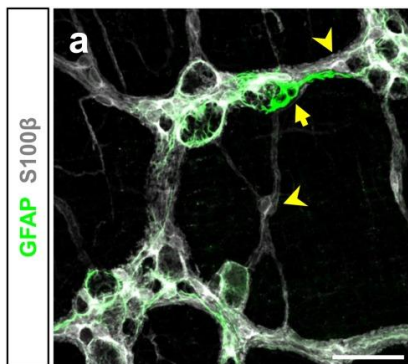
*a* : les cellules gliales entériques expriment la GFP (vert) et peuvent être observées dans et en dehors des ganglions ou des fibres inter-ganglionnaires du plexus myentérique, échelle 50  $\mu\text{m}$  ; *f-i* : projections maximales déconvoluées (haut) et reconstruction 3D (bas) du type-I (*f*), type-II(*g*), type-III(*h*) et type-IV (*e*) de cellules gliales entériques, échelle 20  $\mu\text{m}$  (Boesmans et al., 2015).

## 2. Les marqueurs gliaux

Les CGE possèdent des marqueurs communs avec les astrocytes, mais également des marqueurs généraux qui leur sont propres. Tout comme les astrocytes, leurs filaments intermédiaires nommés glio-filaments sont composés de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) et de vimentine (Rühl, 2005). Tandis que la vimentine est exprimée dans le muscle du tube digestif (Rühl et al., 2001),

la GFAP est un marqueur des CGE au niveau du tube digestif (Jessen and Mirsky, 1980) (Figure 18). Cependant, le marqueur GFAP ne permet pas de distinguer la glie intrinsèque au tube digestif et la glie extrinsèque puisqu'il a été montré que contrairement aux cellules de Schwann myélinisantes, qui perdent l'expression de la GFAP, les cellules de Schwann non myélinisantes conservent l'expression de GFAP (Jessen et al., 1990). Il est intéressant tout de même de noter que les CGE expriment les mêmes isoformes de la GFAP que les astrocytes, tandis que les cellules de Schwann non myélinisantes expriment une forme différente (Jessen and Mirsky, 1985). L'expression de la GFAP reste donc variable d'un type de CGE à un autre (Boesmans et al., 2015).

Parallèlement à cela, de nombreuses études ont montré que dans des conditions inflammatoires (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou stimulation au lipopolysaccharide (LPS)) l'expression de la GFAP augmente dans les CGE (von Boyen et al., 2011; Rosenbaum et al., 2016). Ce phénomène est similaire à celui observé au niveau du SNC lors d'une inflammation systémique (Krstic et al., 2012).



*Figure 18 : Expression de GFAP et S100β par la glie entérique dans le plexus myentérique de l'iléon.*

*Double marquage pour la GFAP (vert) et S100β (gris). Malgré le fait que la plupart des cellules gliales entériques expriment les deux marqueurs, certaines cellules exprimant uniquement l'un des marqueurs peuvent-être observées (flèches), échelle 50 μm (Boesmans et al., 2015).*

Les protéines S100 représentent une famille de 24 protéines de liaison au calcium (Donato et al., 2013). Au sein des CGE c'est l'isoforme S100β qui est présente et utilisée comme marqueur spécifique des CGE au niveau du tube digestif (Figure 18). Ce marqueur n'est pas présent uniquement dans les CGE, il est retrouvé dans de nombreux types cellulaires en dehors du tube digestif comme les astrocytes, les cellules de Schwann, les oligodendrocytes ou encore les fibres musculaires squelettiques (Hachem et al., 2005; Rickmann and Wolff, 1995; Sorci et al., 1999; Vives et al., 2003). La protéine S100β est impliquée dans les mécanismes d'homéostasie du calcium intracellulaire et régule la structure du cytosquelette. Cette protéine stimule la prolifération cellulaire et la migration tandis qu'elle inhibe les mécanismes d'apoptose et de différenciation cellulaire (Donato et al., 2009). C'est une protéine intracellulaire qui de plus peut être excrétée pour agir de manière autocrine et paracrine sur les CGE ou leur environnement (Van Eldik and Wainwright, 2003). L'expression de S100β est modifiée dans les phénomènes d'inflammation digestive (da Cunha Franceschi et al., 2017) et active la voie RAGE/NF-κB (Costa et al., 2019; Seguella et al., 2019).

Sox10 est un facteur de transcription présent au niveau du noyau qui joue un rôle essentiel dans la différenciation des CGE (Britsch et al., 2001; Hoff et al., 2008) et qui représente un marqueur majeur des CGE (Figure 19). Il est retrouvé dans les cellules des crêtes neurales lors de la mise en place du SNE et représente un marqueur de non différenciation pour ces cellules précurseurs

(Boesmans et al., 2015). D'autres marqueurs plus mineurs ont également été reportés tel que la Glutamine synthétase, la protéine Rat neural antigen-2 ou brain-fatty acid binding protéine (Jessen and Mirsky, 1983; Rühl, 2005; Young et al., 2003).

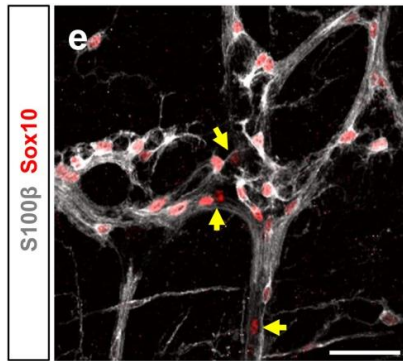


Figure 19 : Expression de Sox10 et S100β par la glie entérique dans le plexus myentérique de l'iléon.

Double marquage pour Sox10 (rouge) et S100β (gris). Une faible proportion de cellules positives pour Sox10 n'exprime pas S100β (flèches), échelle 50 μm (Boesmans et al., 2015).

Plus récemment, un nouveau marqueur des CGE a été découvert : la « proteolipid protein-1 » (PLP-1) (Figure 20). Cette protéine est exprimée dans la grande majorité des CGE tout comme S100β ou Sox10. Cependant, cette protéine connue pour jouer un rôle dans la myélinisation par les cellules Schwann n'a pas encore de fonction identifiée dans les CGE (Rao et al., 2015). Il est suggéré que cette molécule pourrait jouer un rôle dans l'organisation des micro-domaines de signalisation qui regroupent des molécules spécifiques entre elles.

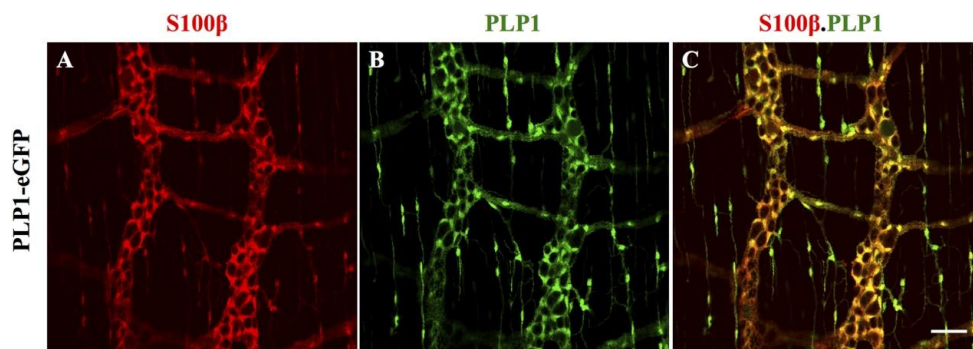


Figure 20 : Expression des marqueurs gliaux dans le plexus myentérique de colon de souris.

Marquage S100β (A, rouge) et PLP1 (B, vert). Une forte colocalisation de ces deux marqueurs (C) est observée dans la glie ganglionnaire et intramusculaire, échelle 50 μm (Rao et al., 2015).

### 3. Le rôle des cellules gliales entériques

Initialement décrites comme des cellules de soutien pour le maintien des structures neuronales, les CGE sont de plus en plus étudiées pour leurs rôles dans le maintien de l'homéostasie digestive. Différents rôles leur ont été attribués au fur et à mesure des études comme un rôle neuroprotecteur, un rôle de régulation des fonctions de la BEI et de l'immunité (Gulbransen and Sharkey, 2012). Ceci est permis grâce à leur localisation dans le tube digestif : à proximité des neurones entériques, du muscle lisse et de l'épithélium digestif.

#### a. Contrôle des neurones entériques

Les CGE, tout comme leurs homologues du SNC, sont essentielles pour la modulation du signal neuronal du fait de leur proximité avec les synapses, mais elles peuvent aussi influencer la survie neuronale par la libération de facteurs trophiques. Il a été montré que les CGE permettent de stabiliser le SNE en ancrant solidement les fibres nerveuses au maillage glial (Gabella, 1981). En



plus de cela, les CGE sont capables de répondre à des stimuli mécaniques, réponse identifiée par l'augmentation du marqueur d'activité précoce c-Fos suivie d'une augmentation du calcium intracellulaire (Sharkey et al., 1999; Zhang et al., 2003). Ces résultats montrent que les CGE sont capables d'ajustements permanents selon les stimuli mécaniques ou métaboliques qu'elles subissent.

### Contrôle de la neurotransmission

Les CGE sont des acteurs-clefs dans la régulation de la neurotransmission au niveau du SNE : elles sont capables de dégrader les neurotransmetteurs extracellulaires en excès au niveau des fentes synaptiques mais peuvent aussi recapter les neurotransmetteurs par des transporteurs spécifiques (Gulbransen and Sharkey, 2012). En effet, les CGE sont capables de recapter le GABA en excès dans la fente synaptique pour stopper son action grâce au transporteur GABA Transporteur-2 (Fletcher et al., 2002). De la même manière, elles sont capables de détoxifier la fente synaptique en diminuant l'excès de glutamate grâce à l'enzyme glutamine synthétase qui permet de convertir le glutamate et l'ammoniac, nocifs pour la jonction neuromusculaire, en glutamine (Fried et al., 2017).

A l'inverse, les CGE peuvent servir de source de précurseurs pour les neurotransmetteurs et potentiellement transmettre ces précurseurs aux neurones pour la synthèse de nouveaux neurotransmetteurs. En effet, les CGE possèdent la glutamine synthétase (permettant la synthèse de la glutamine), le précurseur du glutamate et du GABA (Jessen and Mirsky, 1983). Elles possèdent aussi de la L-arginine précurseur du NO (Nagahama et al., 2001). Le rôle des CGE dans la transmission nitrergique a été davantage appuyé par l'utilisation d'un modèle animal de délétion de CGE mettant en évidence une diminution de la transmission nitrergique et VIPergique chez ces animaux (Aubé et al., 2006).

De plus, les CGE répondent à l'ATP libéré par les neurones entériques. Cette interaction peut être modulée par l'adénosine diphosphate (ADP) qui est lui-même généré par les CGE *via* des phénomènes de dégradation de l'ATP extracellulaire dans la fente synaptique (Gulbransen et al., 2012; Lavoie et al., 2011). Cette médiation de la communication purinergique se fait par la NTPDase2 présente uniquement au niveau de la membrane des CGE (Braun et al., 2004).

Pour finir, les CGE sont activables par d'autres types de neurotransmetteurs comme l'Ach ou la 5-HT indiquant que ces cellules sont impliquées dans les voies de signalisation cholinergique et sérotoninergique (Boesmans et al., 2013).

L'ensemble de ces données appuie le rôle essentiel des CGE dans la régulation de la neurotransmission au niveau du SNE.

### Contrôle de la survie neuronale

La neuroprotection des CGE a été démontrée principalement grâce à un modèle de délétion gliale. Chez des souris ayant une délétion des cellules GFAP<sup>+</sup>, incluant la glie entérique, une dégénérescence des neurones myentériques dans les zones inflammées a été mise en évidence (Bush et al., 1998). Appuyant cet effet protecteur ou trophique des CGE sur les neurones, une

délétion des CGE *in vitro* conduit à une susceptibilité accrue aux effets neurotoxiques du stress oxydatif ; par rapport à une culture avec CGE (Abdo et al., 2010).

Les CGE sont capables de synthétiser de nombreux facteurs neurotrophiques tels que le « glial derived neurotrophic factor » (GDNF), le « Neuronal Growth Factor » (NGF), le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) ou la Neurotrophine-3 (von Boyen et al., 2011; Hansebout et al., 2012; Hoehner et al., 1996). Elles permettent également de protéger du stress oxydatif en stimulant la synthèse de glutathion par la sécrétion de la 15d-prostaglandine J2, une molécule neuroprotectrice (Abdo et al., 2012).

Par ailleurs, les CGE sont primordiales pour la mise en place et la maturation d'un réseau neuronal mature. Ce mécanisme, démontré dans des co-cultures de neurones entériques avec des CGE, passe par des voies dépendantes du GDNF et des purines (Le Berre-Scoul et al., 2017). L'ensemble de ces résultats indiquent que les CGE sont indispensables à la survie neuronale et jouent un rôle essentiel dans la mise en place du réseau nerveux.

Pour finir, en plus de leur capacité à recapter l'excès toxique de neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique, les CGE sont capables de maintenir un microenvironnement protecteur dans le SNE en recaptant les excès de cations. En effet, lors des décharges neuronales, de fortes concentrations d'ions  $K^+$  sont relarguées dans l'espace extracellulaire et ces fortes concentrations peuvent affecter la cinétique des ions et la transmission synaptique (Rühl, 2005). Dans le SNC, il a été montré que les astrocytes sont susceptibles de recapter rapidement l'excès d'ions par leurs canaux  $K^+$  (Walz, 2000). Les CGE, similairement aux astrocytes, possèdent des canaux  $K^+$  capables de jouer un rôle dans la gestion de l'excès toxique d'ions  $K^+$  (Hanani et al., 2000).

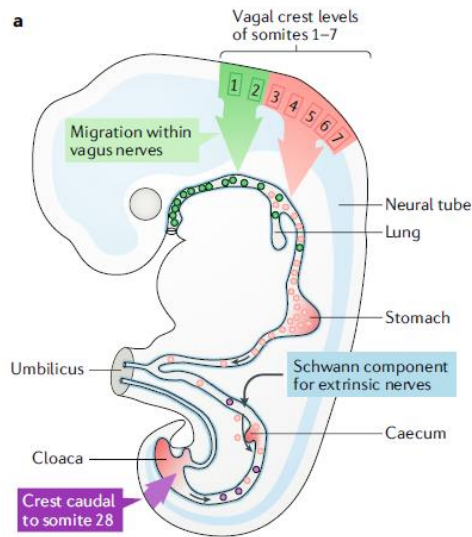
### III. Développement et mise en place du système nerveux entérique

#### A. Embryogénèse

La majorité des cellules du SNE dérivent des cellules de la crête neurale. Selon le segment du tube digestif, l'apport des cellules par les crêtes neurales n'est pas le même (Le Douarin and Teillet, 1973). Les cellules du SNE pour la grande majorité dérivent des somites 1 à 7 de la crête neurale, et commencent une mise en place dans le mésenchyme du tube digestif dès le 9<sup>e</sup> jour de gestation chez la souris selon un sens dorso-ventral (l'équivalent de 4 semaines chez l'Homme) (Burns and Douarin, 1998; Fu et al., 2003). Par la suite ces cellules seront nommées les cellules entériques dérivées de la crête neurale (NCC) et migrent dans un sens rostro-caudal pour coloniser l'intégralité du tube digestif (Kapur et al., 1992). Ce processus se termine vers le 15<sup>e</sup> jour de gestation (environ la 7<sup>e</sup> semaine chez l'Homme) (Fu et al., 2004) (Figure 21). Les NCC migrent à travers l'intestin en formant des chaînes de cellules interconnectées et en avançant dans le sens rostro-caudal, cependant il existe également des cellules isolées en avant du front de migration (Young et al., 2004). Lors du passage sur la zone du caecum, les cellules marquent un temps d'arrêt dans leur migration et changent leur schéma de migration. En effet après le caecum, les cellules semblent migrer de façon isolée sans formation de maillage (Druckenbrod and Epstein, 2005).

Il faut savoir que l'ensemble des cellules du SNE ne proviennent pas des somites 1 à 7. En effet, il a été montré que les somites de la crête neurale sacrée (somite 28) participaient à la mise en place de la partie terminale du tube digestif à partir du 13<sup>e</sup> jour et demi avec une migration dans le sens caudo-rostral (Figure 21). Ces cellules constituent environ 20% de la population neuronale dans la partie distale du tube (Kapur, 2000; Wang et al., 2011b).

Pour finir, les cellules réalisent ensuite une migration centripète en migrant du plexus myentérique jusqu'au sein du tube pour former le plexus sous-muqueux (Fu et al., 2004; Jiang et al., 2003). Cette migration vers la sous-muqueuse va se réaliser à partir de E15,5 (Uesaka et al., 2013)



**Figure 21 : Migration des progéniteurs dérivés des crêtes neurales dans l'intestin primitif.**

Les cellules dérivées de la crête neurale migrent à partir de la zone vagale (somites 1 à 7) dans un sens rostro-caudal permettant la mise en place du système nerveux entérique de l'œsophage au caecum principalement (vert et rouge). A l'opposé, d'autres proviennent de la zone sacrée (somite 28) et migrent dans un sens caudo-rostral permettant la mise en place du système nerveux entérique dans le colon distal (violet). Une troisième source de progéniteurs permet la mise en place de l'innervation extrinsèque du tube digestif (bleu) (Rao and Gershon, 2018).

### B. Maturation du système nerveux entérique

#### 1. Migration et prolifération des précurseurs

Au cours de la colonisation du tube digestif par les NCC, la quantité de cellules est extrêmement importante pour aboutir à la formation d'un SNE fonctionnel. En effet, lors d'une diminution de l'apport en NCC, il a été montré que l'innervation de la partie basse du tube digestive n'est pas correcte ce qui aboutit à des modèles animaux de mégacolon ou similaire à la pathologie de Hirschsprung avec un défaut de SNE au niveau du colon (Barlow et al., 2008; Burns et al., 2000). La prolifération des NCC semble être primordiale sur le front de migration pour assurer une bonne mise en place du SNE, tandis qu'elle ne semble pas indispensable en arrière du front de migration (Simpson et al., 2007). La prolifération indispensable pour mettre en place le SNE au sein du tube digestif se fait de manière identique quelle que soit la zone où se situe le front de migration (Young et al., 2005).

Il a été montré que deux voies majeures sont impliquées dans les phénomènes de prolifération et de migration du SNE (Lake and Heuckeroth, 2013) : la voie Ret/GFR $\alpha$ /GDNF/Neurturin et la

voie de l'endothéline-3, les ligands étant produits par le mésenchyme environnant. D'autres voies sont également impliquées dans la mise en place du SNE.

### a. La voie Ret/GFR $\alpha$ /GDNF/Neurturin

Ret est une tyrosine kinase transmembranaire connue pour être importante dans le développement des crêtes neurales (Heuckeroth et al., 1998). Cette protéine est impliquée dans la voie de signalisation du GDNF et de la Neurturine en s'associant à son co-récepteur GFR $\alpha$ 1 ou GFR $\alpha$ 2 respectivement. L'activation de ces voies de signalisation promeut la prolifération, la migration et la différenciation des NCC en neurones entériques (Gianino et al., 2003; Taraviras et al., 1999). Des mutations sur le gène Ret augmentent fortement les risques de développer une maladie de Hirschsprung (Kapur, 2009), et chez la souris sa délétion complète aboutit à l'absence de SNE le long du tube digestif (Ratcliffe et al., 2011). Il a également été démontré que l'expression de RET est nécessaire à la survie neuronale entérique et que cet effet se fait de façon dose-dépendante (Uesaka et al., 2008).

Le GDNF est indispensable à la première phase de migration le long de l'axe rostro-caudal (Lake and Heuckeroth, 2013), mais il est également indispensable à la phase de migration centripète (Uesaka et al., 2013).

### b. La voie de l'endothéline-3

Une autre voie de signalisation est importante pour la mise en place du SNE : la voie de l'endothéline-3 et de son récepteur endothéline de type B exprimé par les NCC. L'importance de cette voie a été mise en évidence lors d'une délétion de ce récepteur sur les NCC avec l'observation d'une perte de la prolifération, une activation de la migration et de la différenciation. Une mutation dans cette voie de signalisation peut aboutir à une maladie de Hirschsprung (Nagy and Goldstein, 2006). Elle est donc primordiale pour la bonne prolifération des NCC et l'inhibition de leur différenciation. L'endothéline-3 est produite par le mésenchyme environnant et permet la migration des NCC vers l'intestin postérieur (Young et al., 2004).

### c. Les voies accessoires

Les voies de signalisation Ret/GDNF et de l'endothéline-3 ne sont pas les seules à influencer la prolifération et la migration des précurseurs. Des facteurs de transcription tels que SOX10 ou PHOX2B sont exprimés par les NCC après leur début de migration des crêtes neurales et sont impliqués dans la survie et la prolifération des NCC tout en les maintenant dans un état non différencié (Bondurand and Sham, 2013; Pattyn et al., 1999).

Par ailleurs, la matrice extra-cellulaire (MEC) peut elle aussi influencer la migration et la prolifération des NCC. De plus, elle est capable de jouer sur leur polarité, leur différenciation et la gangliogénèse. Effectivement les molécules de la MEC incluant les glycoprotéines, collagènes et protéoglycanes influencent les NCC par des récepteurs exprimés à leur surface (Newgreen and Hartley, 1995; Payette et al., 1988).

En dernier lieu, l'épithélium intestinal possède également la capacité de sécréter des protéines morphogéniques influençant les NCC. Les deux protéines-clefs de cette interaction épithélium-NCC sont la nétrine et la protéine sonic hedgehog. La nétrine est connue pour son rôle de guidance

axonale, et promeut la migration centripète du plexus myentérique vers le plexus sous-muqueux (Seaman et al., 2001). La délétion de nétrine aboutit à des animaux sans plexus sous-muqueux (Jiang et al., 2003). La protéine sonic hedgehog est essentielle pour la régulation de la prolifération et de la différenciation. Elle permet de définir la position radiale du plexus sous-muqueux en régulant la migration des NCC (Nagy and Goldstein, 2017).

### d. La voie des Sémaphorines

Une autre voie de signalisation dans la mise en place du SNE, moins décrite dans la littérature, est celle des molécules sémaphorines. Les sémaphorines sont des glycoprotéines majoritairement impliquées dans le guidage axonal impliquant la croissance des axones, leurs ramifications, et leurs orientations dans des directions précises (Bagri and Tessier-Lavigne, 2002; Fiore and Püschel, 2003). Les sémaphorines sont connues pour jouer un rôle important dans la mise en place des systèmes nerveux centraux et périphériques (Pasterkamp, 2012). Elles se fixent sur leurs récepteurs et permettent, par des phénomènes de répulsion/attraction d'axones, de réguler la mise en place des prolongements neuronaux et des synapses (Jongbloets and Pasterkamp, 2014). Par des effets de gradient, elles sont capables de guider la migration axonale mais également la migration des progéniteurs neuronaux au niveau de la mise en place du SNE (Sasselli et al., 2012).

Les sémaphorines 3 sont l'une des classes les mieux décrites pour cette famille au niveau de la mise en place du tube digestif et du SNE. Elles sont au nombre de sept allant de la sémaphorine 3A à la sémaphorine 3G. Leurs récepteurs obligatoires sont les co-récepteurs Neuropiline-1 et Neuropiline-2, qui contiennent le domaine de liaison des sémaphorines 3. Un récepteur Neuropiline s'associe à un récepteur de type Plexine (Plexine A1 à A4, Plexine D1), qui contient un domaine de signalisation, pour former un récepteur complexe hétérodimère (Tran et al., 2007) (Figure 22). Au niveau du tube digestif ce sont les sémaphorines 3A, 3C, 3D et 3E qui sont retrouvées durant le développement (Jiang et al., 2015). Dans cette étude, il est montré que la sémaphorine 3A est présente dans l'intestin en développement dès E11,5 au niveau du mésenchyme mais ne semble pas être exprimée par les cellules du SNE en développement. La sémaphorine 3C est détectée uniquement à partir de E15,5 dans une petite population cellulaire correspondant aux cellules du SNE et n'est plus apparente à partir de P3. Elle est notamment absente en cas de mutation de délétion de RET qui aboutit à une absence de SNE. La sémaphorine 3D est visible tout le long du développement, et est exprimée par les cellules du SNE en développement. La sémaphorine 3E quant à elle est uniquement détectée à partir de P3.

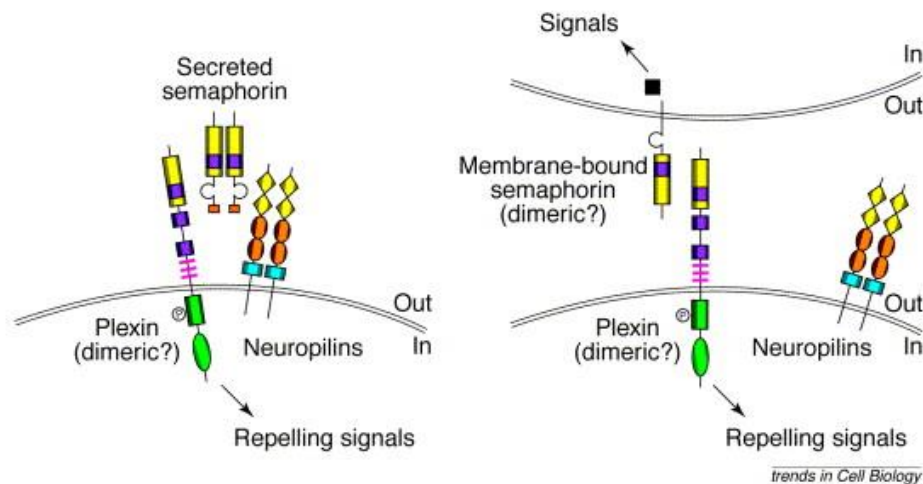


Figure 22 : *Schématisation des récepteurs des sémaphorines sécrétées ou liées aux membranes.*

Les sémaphorines sécrétées (de classe 3) sont dimériques et se lient aux complexes de récepteurs qui incluent les neuropilines (homo ou hétérodimère) et les plexines (probablement dimériques). Les plexines sont des récepteurs spécifiques des sémaphorines et transduisent le signal intracellulaire, les neuropilines étant nécessaires pour la liaison des plexines aux sémaphorines (Tamagnone and Comoglio, 2000).

En plus de leur rôle dans le guidage axonal, ces molécules sont impliquées dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire (Casazza et al., 2007; Tamagnone and Comoglio, 2004). L'équipe de Jiang émet l'hypothèse d'un gradient de sémaphorines de classe 3 synthétisées et sécrétées dans le mésenchyme intestinal le long du tube en développement. L'expression des plexines et neuropilines par les NCC permet la liaison à la sémaphorine 3C/3D et pourrait promouvoir la migration cellulaire (Jiang et al., 2015).

La sémaphorine 3A est une molécule à laquelle nous nous sommes particulièrement intéressés lors de ce travail de thèse. Cette sous-classe de sémaphorine *via* la liaison à ses récepteur permet des phénomènes de répulsion de pousse axonale et de réorganisation du cytosquelette (Goshima et al., 2016). Au niveau du SNE, la sémaphorine 3A est principalement connue pour ses mutations ou polymorphismes dans la maladie de Hirschsprung (Gunadi et al., 2016). En effet, la sémaphorine 3A a été montrée comme primordiale pour l'entrée des NCC venant de la zone sacrée (somite 28) et donc la mise en place du SNE ainsi que des axones entériques dans la partie terminale du SNE (Anderson et al., 2007).

## 2. Différenciation des précurseurs

Une fois la migration réalisée, les NCC vont se différencier en neurones entériques ou en CGE. Ces cellules expriment initialement la protéine Ret et le facteur de transcription Sox10, mais lors de leur différenciation la sous-population de neurones ne maintient que l'expression de Ret tandis que les CGE ne maintiennent que l'expression de Sox10 (Figure 23). Lors de la différenciation, ces molécules connues pour maintenir les NCC dans un état non différencié perdent cette fonction par des mécanismes encore peu connus à l'heure actuelle.

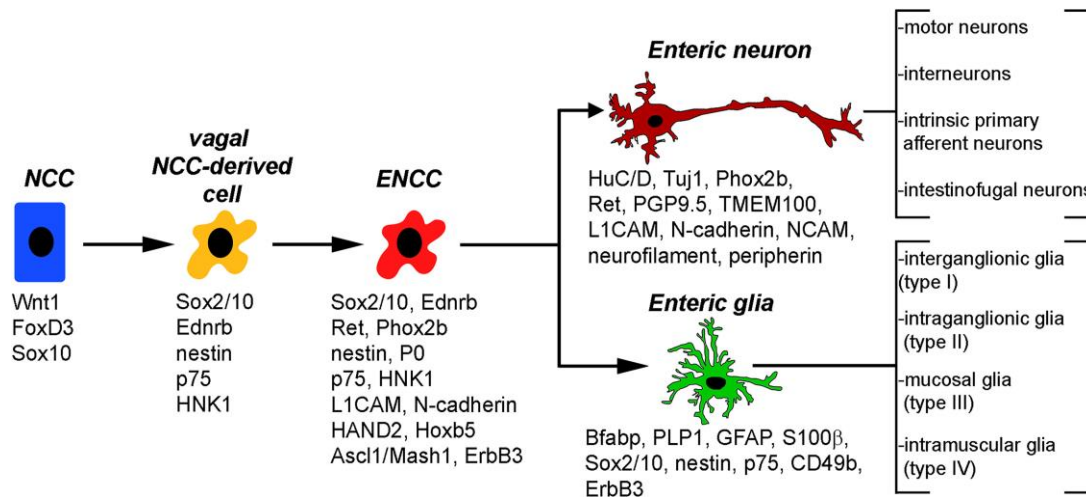


Figure 23 : Représentation de la différenciation progressive des NCC en cellules entériques de la crête neurale (ENCC) puis en neurones et cellules gliales entériques. (Nagy and Goldstein, 2017).

Plusieurs facteurs solubles produits par le mésenchyme intestinal favorisent la différenciation des NCC en neurones ou CGE : le GDNF, la neurotrophine-3, les BMP (Bone Morphogenetic Protein) ou encore des facteurs de transcription.

#### a. Le GDNF

Le GDNF est connu pour participer à la migration des NCC *via* la voie Ret/GDNF, mais il contribue également à promouvoir la différenciation des NCC en neurones et non en CGE. Ceci est possible par la diminution de l'expression du facteur de transcription Sox10 (Uesaka et al., 2013).

#### b. La neurotrophine-3

La neurotrophine-3 est une protéine mise en évidence pour son rôle important dans le développement du SNE. Cette protéine agit directement sur les précurseurs neuronaux entériques et va permettre la différenciation des précurseurs en neurones et/ou en CGE. En plus de cet effet de différenciation, il est montré que la neurotrophine-3 est importante pour la survie cellulaire lors du développement (Chalazonitis, 2004). Ses effets sont en partie dépendants de la liaison au récepteur tyrosine kinase TrkC, qui a une expression dépendante de la présence des protéines BMPs.

#### c. Les BMPs

Les protéines BMPs, connues pour leurs effets dans le maintien de l'intégrité de la BEI par des phénomènes de renouvellement et de différenciation cellulaire, jouent aussi un rôle dans la mise en place du SNE. Les protéines BMP-2 et BMP-4 permettent une diminution de la migration des NCC et une augmentation de la formation de la glie entérique ainsi que de la différenciation neuronale (Goldstein et al., 2005).

#### d. Le facteur de transcription Mash1

Des facteurs de transcription peuvent intervenir dans les mécanismes cellulaires de mise en place du SNE. Le facteur Mash1 est montré comme nécessaire à la migration et à la différenciation précoce des NCC (Blaugrund et al., 1996). Ce facteur de transcription est exprimé dans la totalité

de la population de NCC, mais lorsque celui-ci est réduit un défaut de migration des progéniteurs du SNE est observé avec une différenciation prématurée des neurones entériques en diminuant l'expression de Sox10 (Bondurand et al., 2006; Laranjeira and Pachnis, 2009).

### *3. Maturation du réseau nerveux*

Bien entendu ces phénomènes de prolifération et de différenciation se font en parallèle des phénomènes de migration. C'est pourquoi il est possible d'observer des marqueurs de neurones entériques ou de CGE alors même que la mise en place du SNE n'est pas terminée (Figure 24). Il est donc possible d'observer l'expression de marqueur gliaux (S100 $\beta$ ), pan-neuronaux (la protéine Hu et neurofilaments M) (Young et al., 2005) ou encore des marqueurs de neurotransmetteurs ChAT (Gershon, 1997), 5-HT ou neuropeptide Y (Pham et al., 1991). De manière intéressante, les projections axonales des premiers neurones différenciés projettent de façon caudale et sont étroitement associées à la migration des NCC. Ce phénomène peut s'expliquer en partie par la présence de molécules capables de gérer la migration des NCC et la guidance axonale (Young et al., 2002). D'autres marqueurs neuronaux apparaîtront après la fin de la migration des NCC. Effectivement, l'apparition des sous-types de neurones se fait dans un ordre séquentiel : les neurones sérotoninergiques apparaissent les premiers (E8) puis vient le tour des neurones cholinergiques (E8), les neurones à neuropeptides (E10), etc. (Pham et al., 1991). En parallèle de cela, des phénomènes de synaptogénèse se mettent en place. Les premiers marqueurs de synapse s'observent à E12,5 au niveau de l'intestin grêle, mais ces contacts synaptiques restent cependant immatures. Ce n'est qu'à E16,5 que la première structure synaptique mature est observée avec des vésicules présynaptiques denses et des synapses en boutons présentes tout le long du tube digestif. A P0 une activité synaptique est enregistrable dans la plupart des neurones entériques (Hao et al., 2013)

Les marqueurs gliaux apparaissent de leur côté plus tardivement que les marqueurs neuronaux (Young et al., 2003) avec une apparition de S100 $\beta$  précoce (E14,5), mais une apparition de GFAP seulement à partir du 16<sup>e</sup> jour d'embryogénèse (Rothman et al., 1986).



E7-9	Migration des cellules souches de la crête neurale (somite 1 à 7) vers l'œsophage
E8-9,5	Apparition des progéniteurs neuronaux entériques (NCC)
E8-E14	Apparition des neurones ChAT <sup>+</sup> et 5-HT <sup>+</sup> Début apparition des neurones ChAT <sup>+</sup> dans la sous-muqueuse
E10-E18	Apparition des neurones à neuropeptides (VIP <sup>+</sup> /Neuropeptide Y <sup>+</sup> ) et CGRP <sup>+</sup>
E10,5-11,5	Apparition du marqueur pan neuronal Hu
E13	Migration des cellules de la crête neurale sacrée (somite 28) vers le colon distal
E14,5	Apparition du marqueur S100β
E15	Fin migration des cellules NCC
E16	Apparition du marqueur GFAP
E16,5	Apparition des synapses matures
P0	Apparition des premières contractions non spontanées
P0-P10	Migration des CGE vers le plexus sous-muqueux et la muqueuse
P0-P20	Augmentation de l'immunoréactivité NOS et ChAT
P0-P36	Réorganisation structurale du SNE
P10	Apparition des premières contractions spontanées

Figure 24 : *Développement temporel du SNE.*  
Adapté de (Hao et al., 2016; Pham et al., 1991; Young et al., 2003, 2005).

#### 4. Maturation post-natale du réseau nerveux

La maturation du SNE n'est pas terminée à la naissance chez l'Homme, tout comme chez la souris, et continue dans la période post-natale permettant ainsi la mise en place de fonctions-clefs comme la motricité digestive. Au cours la maturation post-natale, les phénotypes neurochimiques neuronaux se mettent progressivement en place, comme par exemple une augmentation de la proportion de neurones à Nitric-Oxyde Synthase (NOS) ou neurones ChAT, mise en évidence par une augmentation de l'immunoréactivité entre le jour de naissance et le 20<sup>e</sup> jour post-natal (de Vries et al., 2010). Chez la souris, au moment de la naissance des complexes moteurs se mettent en place mais ne permettent pas encore une contraction propulsive correcte du tube digestif. Ce n'est qu'à partir du 10<sup>e</sup> jour post-natal, en parallèle de l'augmentation de l'innervation cholinergique au niveau musculaire, que les contractions spontanées se mettent en place (Roberts et al., 2007; de Vries et al., 2010). Au cours de la maturation post-natale, il a également été montré une réorganisation des ganglions du SNE au niveau du plexus myentérique : à un stade précoce un réseau neuronal visible avec des cellules isolées, puis au fur et à mesure du développement post-natal une mise en place d'un réseau dense de ganglions avec des fibres interganglionnaires s'effectue : ce processus étant nommé la gangliogénèse (Figure 25).

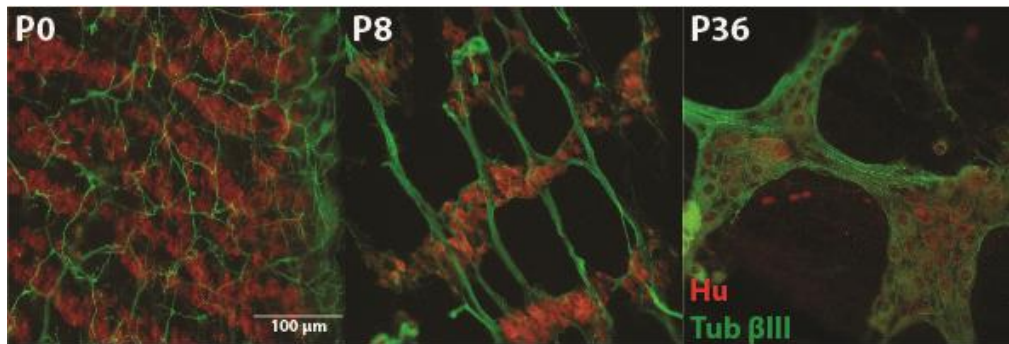


Figure 25 : Mise en place du réseau nerveux au sein du tube digestif dans les périodes post-natales chez le raton. Les neurones sont marqués par un anticorps anti-HuC/D (rouge) et les prolongements neuronaux sont marqués par un anticorps anti-Tub-βIII (vert) au cours de différents stades de maturation post-natale : jour de naissance (P0), 8<sup>e</sup> jour post-natal (P8) et 36<sup>e</sup> jour post-natal (P36), échelle 100 μm.

Néanmoins la maturation post-natale ne concerne pas uniquement le réseau neuronal mais concerne aussi les CGE. En effet, il a été montré dans un modèle murin qu'à la naissance les CGE se situaient uniquement au niveau des plexus nerveux et qu'à partir du 10<sup>e</sup> jour post-natal une mise en place du réseau glial se réalisait au sein de la lamina propria avec une augmentation du nombre de CGE par villosité (Kabouridis et al., 2015). Une augmentation des marqueurs gliaux est démontrée dans les cellules Sox10<sup>+</sup> au cours de la maturation post-natale avec une augmentation des marqueurs gliaux GFAP et S100β ainsi qu'une modification de leur localisation intracellulaire (Cossais et al., 2016).

#### IV. Le rôle du système nerveux entérique dans les grandes fonctions digestives

##### A. Contrôle de la motricité digestive

###### 1. Le rôle des neurones entériques

La motricité digestive permet l'avancée du bolus alimentaire dans le tube digestif et possède plusieurs mécanismes-clés : le péristaltisme permet une avancée rapide du bolus alimentaire, la segmentation permet de fragmenter et de mélanger le bolus, les complexes migratoires moteurs permettent une avancée lente en dehors de la période postprandiale, et la rétropropulsion permet d'évacuer en cas d'ingestion de toxine.

La paroi du tube digestif dispose de deux couches de muscles lisses pour permettre les phénomènes de motricité digestive : les muscles lisses circulaires et les muscles lisses longitudinaux. Ces muscles ayant besoin d'être stimulés pour induire une contraction spontanée, des cellules pacemakers sont présentes dans le tube digestif : ce sont les cellules interstitielles de Cajal (CIC).

Ces cellules permettent de faire la communication directe entre les neurones entériques et les cellules musculaires, et peuvent recevoir des ajustements de ces mêmes neurones entériques pour adapter leurs décharges rythmiques spontanées (Figure 26). Les CIC sont responsables d'une activité de décharge à onde lente (Huizinga and Lammers, 2009). Des études ont démontré que lorsque ces cellules étaient supprimées dans un modèle animal, les mécanismes de péristaltisme ne se faisaient pas naturellement à moins d'une stimulation externe, confirmant ainsi la notion de pacemaker de l'intestin pour ces cellules (Huizinga et al., 1995). Les CIC sont des cellules étoilées présentes entre les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires, elles sont proches du

plexus myentérique permettant une communication directe avec le muscle ou les neurones entériques. Leur distribution dépend de la région du tube digestif mais aussi de l'espèce étudiée (Ward and Sanders, 2001). Elles permettent une diffusion des ondes lentes de contraction tout le long du tube digestif grâce à leurs interconnexions entre elles ou aux cellules musculaires lisses par des GAP jonctions. Ce mécanisme permet la segmentation du bolus alimentaire. Les CIC peuvent être modulées par les neurones entériques grâce à l'expression de récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le NO ou VIP (Ward, 2000) ou excitateurs tels que l'Ach ou la substance P (Ward and Sanders, 2001) (Figure 26). Il faut cependant noter que les CIC seules ne font pas toute la connexion neuromusculaire, en effet les cellules musculaires lisses expriment également des récepteurs aux neurotransmetteurs. Les CIC permettent davantage une modulation ou amplification du signal neuronal.

### ENTERIC MOTOR NEUROTRANSMISSION

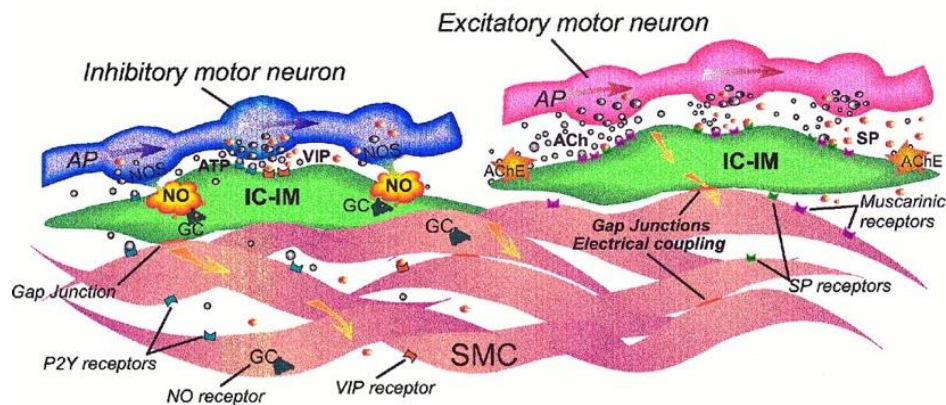


Figure 26 : Jonction neuromusculaire du tube digestif mettant en jeu les cellules interstitielles de Cajal.

Les cellules interstitielles de Cajal peuvent être stimulées par des neurones via la sécrétion de neurotransmetteurs inhibiteurs (VIP/NO/ATP) ou excitateurs (ACh/substance P) aboutissant à des phénomènes de relaxation/contraction du muscle intestinal ou par communication directe (GAP jonctions). Les cellules musculaires expriment également les récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs/excitateurs. L'ensemble de ces mécanismes permettent la mise en place du péristaltisme intestinal. Adapté de (Ward and Sanders, 2001).

Les complexes migratoires moteurs sont une sorte programme de motricité de l'intestin grêle qui est présent même en dehors des périodes de digestion. Ce sont des contractions circulaires qui ont lieu de l'estomac au terminus de l'intestin grêle. Ce mécanisme permet de nettoyer le tube digestif en décrochant les débris de l'ingestion précédente (Wood, 2016).

Une fois l'ingestion d'aliment effectuée, les complexes migratoires moteurs sont immédiatement stoppés pour donner lieu à un phénomène de péristaltisme et de segmentation (Furness, 2006). Le péristaltisme est une contraction du tube digestif permettant une avancée du bolus alimentaire de la bouche vers l'anus, avec des phénomènes de contraction du côté oral et de relaxation du côté aboral. Ce mécanisme est initié par un stimulus comme par exemple une distension mécanique de la muqueuse ou une modification du pH permettant une activation des cellules entéroendocrines et la libération de 5-HT (Figure 27). Cette libération de 5-HT active les IPANs, qui à leur tour transmettent l'information aux interneurons ascendants et descendants *via* la sécrétion de neurotransmetteurs (Furness, 2000). Les interneurons ascendants envoient des signaux excitateurs aux neurones moteurs (ACh/Substance P) permettant une contraction en amont du

bolus alimentaire, tandis que les interneurons descendants envoient des signaux inhibiteurs aux neurones moteurs excitateurs et des signaux activateurs aux neurones moteurs inhibiteurs (NO/VIP/ATP) permettant une relaxation du tube digestif en aval du bolus alimentaire (Bornstein et al., 2004).

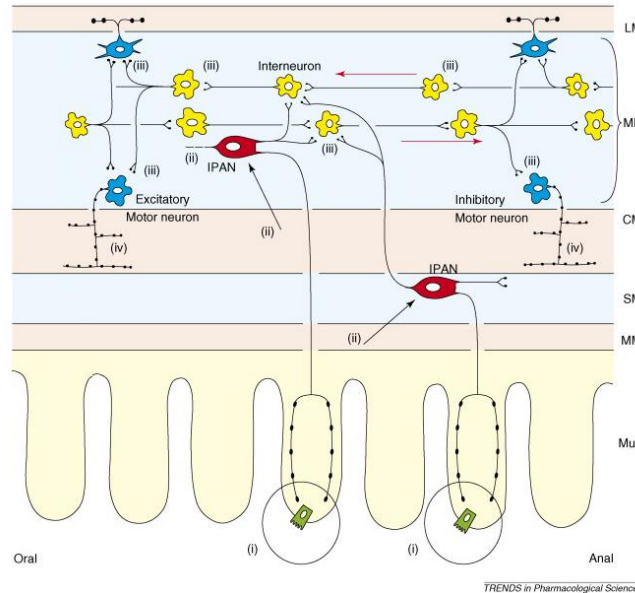


Figure 27: Représentation simplifiée du circuit de contrôle moteur.

La motricité réflexe est initiée par les IPANs, qui sont connectés aux interneurons ascendants et descendants du plexus myentérique. Les interneurons sont en dialogue avec les neurones moteurs qui innervent directement les couches musculaires. (i) : L'interface entre les cellules entéroendocrines et les terminaisons nerveuses des IPANs ; (ii) L'excitabilité et mode de déclenchement des IPANs ; (iii) Les synapses entre IPANs et interneurons ; (iv) La jonction neuromusculaire. CM : muscle circulaire ; LM : muscle longitudinal ; MM : muqueuse musculaire ; MP : plexus myentérique ; Muc : muqueuse ; SM : sous-muqueuse. Adapté d'après (De Giorgio et al., 2007).

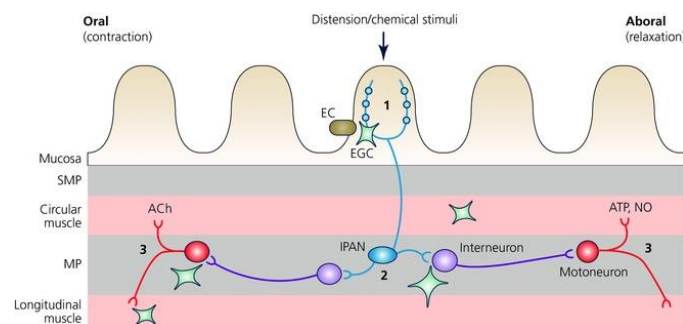
## 2. Le rôle des cellules gliales entériques

Contrairement aux neurones entériques capables de générer des potentiels d'action, les CGE sont non excitables électriquement (Hanani et al., 2000). Néanmoins, les CGE possèdent une activité médiée par le calcium cytosolique relargué suite à une stimulation *via* l'ATP majoritairement (Kimball and Mulholland, 1996) ou suite à un relargage de médiateurs autocrines ou provenant des neurones entériques (Delvalle et al., 2018; Grubišić et al., 2018). Le calcium peut également provenir de l'espace extracellulaire, en entrant par l'intermédiaire de GAP jonctions formées de connexine 43. Ces GAP jonctions représentent un moyen d'échange important pour les CGE permettant, en plus de l'entrée du calcium extracellulaire, l'échange d'ATP et la propagation de calcium de proche en proche dans les CGE (Cotrina et al., 1998; Zhang et al., 2003). Ces cellules sont donc capables de propager ou moduler une signalisation calcique de manière autocrine et paracrine. Une stimulation par de l'ATP ou de l'ADP *in vitro* des CGE a montré que l'excitabilité des CGE est majoritairement médiée par les purines. Une stimulation électrique des neurones *in situ* induit une propagation de la vague calcique dans les CGE, indiquant que les purines sont potentiellement libérées par les neurones entériques au niveau de la fente neuro-gliale (Gulbransen and Sharkey, 2009). Une étude plus récente montre que le rôle des CGE dans la motricité digestive ne passe pas uniquement par les mécanismes impliquant l'ATP. La modulation de l'activité neuronale peut impliquer une voie de signalisation dépendant de l'Ach, le neurotransmetteur majoritaire au niveau du tube digestif, en augmentant l'excitabilité des neurones *via* le relargage

de gliomédiateurs et donc en modulant indirectement les réflexes de motricité (Delvalle et al., 2018).

L'excitabilité des CGE joue donc un rôle essentiel dans la modulation de la motricité digestive par la signalisation calcique (Grubišić and Parpura, 2017). Ceci est démontré par la perte de la communication gliale chez des souris qui n'expriment pas la connexine 43, provoquant ainsi des dysfonctions de la motricité digestive *in vivo* avec des contractions faibles du colon et une augmentation du temps de transit intestinal (McClain et al., 2014). De même, renforçant l'idée que les CGE sont impliquées dans la motricité digestive, des études montrent que lors d'une déplétion des CGE les fonctions digestives sont altérées. Cette altération reste néanmoins différente selon le type de délétion génétique : par exemple lors d'une délétion des cellules GFAP<sup>+</sup> les animaux présentent une augmentation du temps de transit (Aubé et al., 2006), tandis que lors d'une délétion des cellules PLP1<sup>+</sup> la motricité est affectée de façon sexe-spécifique avec une accélération du temps de transit et du nombre de complexes moteurs myoélectriques uniquement chez les femelles (Rao et al., 2017).

Toujours est-il que les mécanismes directs par lesquels les CGE influencent la motricité digestive ne sont pas encore élucidés à l'heure actuelle. Il est suggéré que les CGE peuvent jouer un rôle dans les réflexes de péristaltisme. Ces cellules, présentes au niveau de la muqueuse intestinale, sont sensibles à la 5-HT libérée par les cellules entérochromaffines et pourraient donc moduler la communication entre les cellules entérochromaffines et les IPANs. Les CGE peuvent influencer le transfert de l'information au niveau du plexus myentérique puisqu'elles sont en contact direct avec l'ensemble des intervenants du réflexe péristaltique (Figure 28) (Grubišić et al., 2018). De plus, les CGE pourraient influencer directement les cellules musculaires lisses lors des phénomènes de contraction du fait de leur proximité avec ces dernières.



**Figure 28 : Schématisation de l'implication des cellules gliales entériques dans le réflexe péristaltique.**

Ce réflexe inclut la succession de plusieurs événements : un stimulus chimique ou mécanique active les IPANs, ceux-ci activent ensuite les interneurons qui projettent dans les deux sens, puis activation des motoneurons pour induire une contraction au niveau oral et une relaxation au niveau aboral. Les cellules gliales entériques (EGC) peuvent intervenir dans ce réflexe péristaltique à chaque étape du réflexe : en contact avec les cellules entérochromaffines (EC), les neurones sensoriels (IPANs), les interneurons, les motoneurons ou même directement avec le muscle lisse. SMP : plexus sous-muqueux, MP : plexus myentérique (Grubišić and Gulbransen, 2017).

### B. Contrôle de la barrière épithéliale intestinale

#### 1. Le rôle des neurones entériques

Comme expliqué précédemment, les neurones entériques ont une forte proximité avec l'épithélium digestif grâce à l'innervation des neurones sous-muqueux et myentériques. Plusieurs travaux suggèrent que ces neurones sont capables de réguler les fonctions de perméabilité de la

BEI et de prolifération des CEI par l'intermédiaire de neurotransmetteurs tels que l'Ach, le VIP, la substance P, etc. (Snoek et al., 2010).

### a. Contrôle de la perméabilité

La perméabilité intestinale peut être fortement influencée par la libération de VIP des neurones entériques. Ce phénomène a été démontré par plusieurs études : lorsque ces neurones sont stimulés électriquement, ils réalisent une décharge de VIP diminuant ainsi la perméabilité paracellulaire dans le colon humain (Neunlist et al., 2003). Le VIP est aussi capable de diminuer la perméabilité transcellulaire dans des cultures de CEI comme les Caco-2 (lignée de CEI provenant d'un carcinome de colon) ou organoïdes intestinaux. Ce mécanisme passe par la régulation de la protéine de jonction serrée ZO-1 (Puzan et al., 2018).

L'Ach quant à lui permet d'augmenter à la fois la perméabilité paracellulaire et transcellulaire de la BEI, effet similaire à celui de la libération de substance P au niveau de la muqueuse digestive (Boudry et al., 2011; Cameron and Perdue, 2007; Neunlist et al., 2012). Il a également été montré que la neurokinine A augmente la perméabilité au niveau du duodénum sans passer par les récepteurs nicotiques (Hällgren et al., 1998).

Certaines hormones libérées par les neurones entériques sont capables de réguler les fonctions de perméabilité intestinale : c'est le cas de l'ocytocine qui diminue la perméabilité, effet démontré suite à la délétion de son récepteur aboutissant à une augmentation de la perméabilité transcellulaire (Welch et al., 2014).

Il existe un contrôle neuronal de l'effet des molécules du lumen sur la perméabilité. C'est par exemple le cas pour les sels biliaires secondaires, des métabolites bactériens présents au niveau du lumen. L'acide désoxycholique produit une augmentation de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire au niveau du colon. Cet effet est modulé en partie par les neurones entériques car lors du blocage des récepteurs cholinergiques avec de l'atropine, l'effet d'augmentation de la perméabilité de ce sel biliaire est inhibé (Sun, 2004). Cependant ceci n'est qu'un effet partiel des neurones entériques puisque l'effet majoritairement observé sur la perméabilité provient d'un dommage de la monocouche cellulaire (Forsgård et al., 2014).

L'ensemble de ces données suggèrent donc une régulation fine de la perméabilité par les neurones entériques, mécanismes pouvant bien entendu faire intervenir les CGE.

### 2. Le rôle des cellules gliales entériques

De nombreuses études montrent l'importance des CGE dans le maintien de la BEI. Les CGE ont été montrées comme bénéfiques pour la BEI en régulant la perméabilité intestinale, les phénomènes de réparation de l'épithélium digestif et la prolifération des CEI (Neunlist et al., 2014). Ceci est permis par la forte proximité entre les CGE et la muqueuse intestinale (Figure 29) (Boesmans et al., 2015).

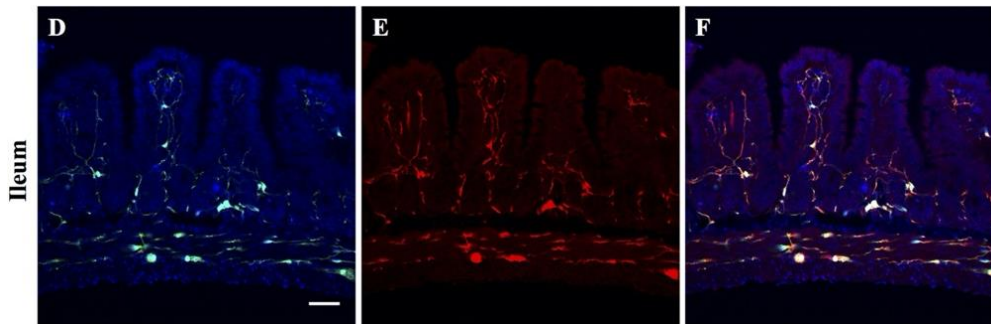


Figure 29 : Co-expression de PLP1 et S100 $\beta$  à proximité de l'épithélium dans l'intestin murin adulte.

D : fluorescence de PLP-eGFP (vert) dans un intestin de souris transgénique PLP1-eGFP ; E : marquage immunohistochimique de S100 $\beta$  (rouge) ; F : Superposition de la fluorescence PLP-eGFP (vert) et S100 $\beta$  (rouge) indiquant que les cellules S100 $\beta$  co-expriment PLP1, échelle 50  $\mu$ m (Rao et al., 2015).

#### a. Contrôle de la perméabilité intestinale

La première preuve de l'implication des CGE dans la perméabilité intestinale a été mise en évidence lors d'une délétion spécifique des CGE au sein du tube digestif. Dans ce modèle une rupture de l'intégrité de la BEI est observée (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001), accompagnée d'une augmentation importante de la perméabilité intestinale. Cette délétion sévère des CGE induit un phénotype inflammatoire important pouvant faire penser que l'inflammation joue un rôle-clé dans ce phénomène de rupture de la BEI. Nonobstant, même en l'absence de phénomène inflammatoire, la délétion moins sévère des CGE entraîne une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Aubé et al., 2006; Savidge et al., 2007). Dans un modèle de co-culture de CGE avec une monocouche de CEI, les CGE augmentent la résistance de la BEI et réduisent la perméabilité paracellulaire grâce à une augmentation de l'expression des protéines de jonctions serrées (Savidge et al., 2007). Ces effets semblent être médiés par le « Glial derived S-NitroGlutathione » (GSNO) connu pour être sécrété par les CGE. Cet effet est démontré par l'application directe du GSNO sur une monocouche de CEI reproduisant ainsi l'effet des CGE observé sur les CEI (Figure 30).

Le GSNO est aussi connu pour son rôle protecteur envers la BEI lors d'une infection au *Shigella Flexneri*. Les CGE et le GSNO préviennent l'invasion en diminuant l'expression de la protéine CDC42 impliquée dans les mécanismes d'invasion des CEI par *Shigella Flexneri* (Flamant et al., 2011). Les CGE peuvent par ailleurs protéger la BEI contre des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  grâce à la libération de GDNF. Cela a été mis en évidence dans un modèle de colite chronique au dextran sulfate sodium où les fonctions de la BEI sont restaurées suite à l'administration de GDNF (Zhang et al., 2010). Les CGE peuvent aussi restaurer les fonctions de la BEI *via* l'inhibition du NO dans une co-culture CGE-CEI stimulée au LPS (Xiao et al., 2011).

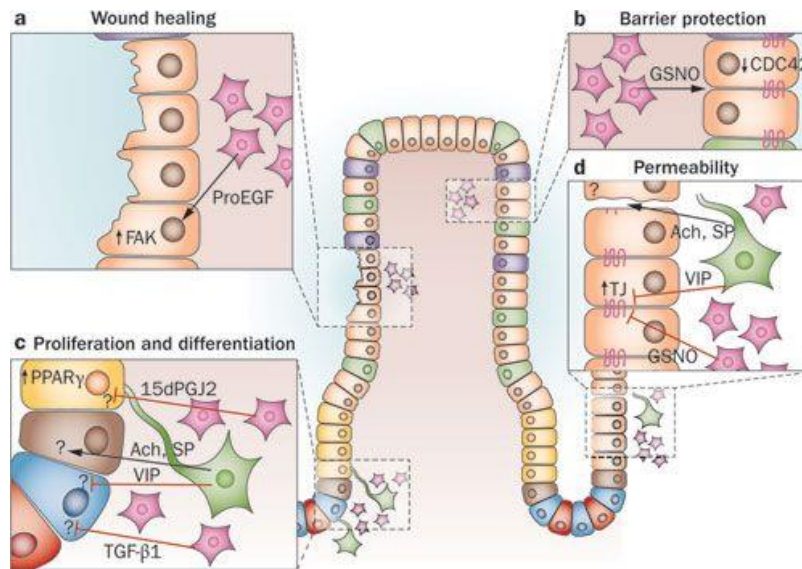


Figure 30 : **Régulation des fonctions de la barrière épithéliale intestinale par les neurones et les cellules gliales entériques.** Les neurones (vert) et les cellules gliales entériques (rose) produisent différents facteurs solubles qui régulent les fonctions de la barrière épithéliale intestinale. **a** : les cellules gliales entériques peuvent augmenter les mécanismes de réparation par le relargage de proEGF qui augmente l'expression et l'activité de FAK ; **b** : Les cellules gliales entériques protègent la barrière épithéliale intestinale lors d'infections à un pathogène par le relargage de GSNO aboutissant à une augmentation de la résistance de la barrière épithéliale intestinale et une diminution de l'expression de CDC42 ; **c** : Les neurones et les cellules gliales entériques sont capables de relâcher des facteurs qui inhibent la prolifération des cellules épithéliales intestinales (TGF $\beta$ 1, VIP, 15dPGJ2) et à l'inverse les neurones peuvent sécréter des neurotransmetteurs capables de l'augmenter (Ach, Substance P (SP)) ; **d** : Les neurones et les cellules gliales entériques sont capables de réguler la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale, en l'augmentant (Ach, Substance P) ou en la diminuant (VIP, GSNO) (Neunlist et al., 2012).

### b. Contrôle de la réparation

Les CGE interviennent dans les phénomènes de réparation de la BEI suite à une lésion. Il a été montré qu'une augmentation de l'expression de la GFAP suite à une stimulation du nerf vague, résultant en l'activation des CGE, pouvait prévenir l'augmentation de la perméabilité induite par une lésion (par exemple une brûlure de la muqueuse intestinale) (Costantini et al., 2010). Ce phénomène de réparation est médié par le GSNO qui a un effet promoteur sur la réparation de la BEI. Pour renforcer le rôle des CGE dans la réparation, il a été montré dans un modèle de délétion des CGE que suite à l'induction d'une colite au dextran sulfate sodium, la muqueuse intestinale est davantage endommagée et les phénomènes de réparation de la BEI sont moins actifs (Van Landeghem et al., 2011). Cet effet de réparation de la BEI a également été démontré *in vitro*, sur une monocouche de CEI lésée mécaniquement ou par des stimuli inflammatoires. Cette réparation passe par la libération de proEGF par les CGE, permettant ainsi l'activation au niveau des CEI de la FAK, une protéine importante dans les phénomènes de migration des CEI vers la zone lésée (Figure 30) (Van Landeghem et al., 2011). Une étude plus récente du même laboratoire a montré que certains médiateurs lipidiques libérés par les CGE, comme par exemple le 11 $\beta$ -Prostaglandine F2 $\alpha$ , pouvaient promouvoir la réparation de la BEI (Coquenlorge et al., 2016).

### C. Contrôle de l'immunité digestive

#### 1. Le rôle des neurones entériques

Dans un modèle d'hyperplasie du SNE, avec une forte densité de neurones entériques, les animaux ont tendance à développer une inflammation beaucoup plus chronique lors de déclenchement d'une colite, par rapport à des souris sauvages (Margolis et al., 2011). Les mécanismes par



lesquels les neurones entériques augmentent l'inflammation ne sont pas encore très étudiés, mais cette réponse semble passer par le relargage de molécules pro-inflammatoires. Les neurones entériques libèrent, suite à un stimuli au LPS, de la prostaglandine D2 connue pour être pro-inflammatoire (Le Loupp et al., 2015) ou des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  (Coquenlorge et al., 2014), l'IL-6 ou le monocyte chemoattractant protein-1 (Burgueño et al., 2016).

A l'opposé, les neurones entériques peuvent aider à protéger de l'inflammation comme démontré *in vitro* dans une culture de SNE où une stimulation au LPS active la voie Wnt, une voie anti-inflammatoire qui régule négativement la voie NF- $\kappa$ B (Di Liddo et al., 2015). Les neurones entériques peuvent aussi sécréter des neurotransmetteurs capables de moduler l'activité des leucocytes intestinaux et jouent donc un rôle dans la modulation de l'inflammation intestinale (Margolis and Gershon, 2016).

### 2. Le rôle des cellules gliales entériques

Lorsqu'elles sont activées les CGE peuvent contribuer à l'environnement pro-inflammatoire en sécrétant des cytokines ou des molécules immuno-modulatrices (Figure 31). Par exemple lorsqu'elles sont activées par un stimulus inflammatoire (cytokines pro-inflammatoires, ATP, LPS), elles peuvent augmenter l'expression voire sécréter de la GFAP ou S100 $\beta$ , phénomène indicateur d'une gliose réactive (Robel and Sontheimer, 2016). La glie réactive peut en outre produire du NO et relâcher de l'ATP. L'ensemble de ces sécrétions ont un effet neurotoxique ce qui provoque des dommages au SNE lors d'une inflammation aiguë (Brown et al., 2016; Donato et al., 2013). Les CGE sont aussi capables de libérer des cytokines ou chemokines pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$ , la chemokine ligand 20 ou la prostaglandine D2 (Fagbemi et al., 2013; Le Loupp et al., 2015; Rosenbaum et al., 2016). Les données concernant la sécrétion de TNF $\alpha$  suite à une stimulation au LPS restent cependant encore débattues (Coquenlorge et al., 2014; Guedia et al., 2016).

A l'opposé, les CGE peuvent contribuer à un environnement anti-inflammatoire. Cela se fait par la libération de molécules anti-inflammatoires comme le GDNF, le GSNO ou la 15d-PGJ2 (Abdo et al., 2012; von Boyen et al., 2011). Le GDNF diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires sur les cellules de l'immunité innée (Ibiza et al., 2016). Le GSNO connu pour son rôle sur la BEI, peut inhiber la voie du NF- $\kappa$ B qui promeut une signalisation pro-inflammatoire (Li et al., 2016b). La 15d-PGJ2 quant à elle est neuroprotective et permet de contribuer au microenvironnement anti-inflammatoire. Les CGE par un contact cellule-cellule peuvent également diminuer la prolifération des LT activés (Kermarrec et al., 2016).

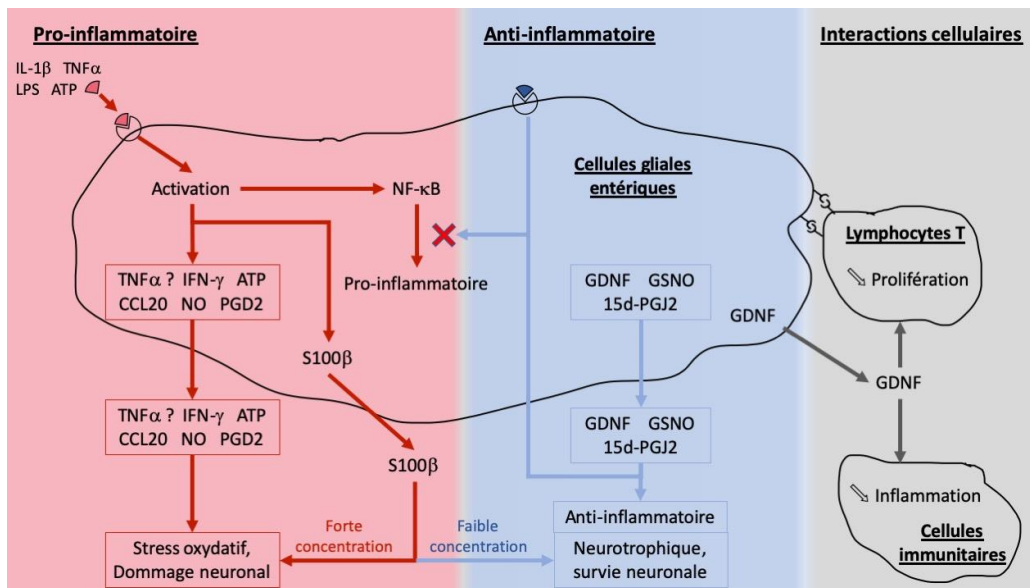


Figure 31 : Vue d'ensemble des réponses gliales entériques en relation avec l'inflammation.

Les voies en rouge (gauche) sont pro-inflammatoires, tandis que les voies en bleu (centre) sont anti-inflammatoires. Les cellules gliales entériques peuvent également interagir avec des cellules de l'immunité (gris, droite). Adapté d'après (Chow and Gulbransen, 2017).

## Le microbiote intestinal

### I. Présentation générale

L'étude du microbiote intestinal commença durant les années 1880 avec l'expansion de la bactériologie suite aux découvertes de Koch sur la source du choléra et de la tuberculose. Grâce au développement des techniques de culture bactérienne, l'étude des bactéries fécales d'enfants et d'adultes a démarrée durant cette période (Friedmann, 2014). Quelques années plus tard, Theodor Escherich isola et mit en évidence 19 bactéries différentes dans les selles d'enfant. Il fut le premier à décrire en détail une bactérie intestinale : *Bacterium coli commune* aussi nommée de nos jours *Escherichia coli*. Escherich démontra que l'intestin du nouveau-né et le méconium était stérile, et que la colonisation bactérienne intestinale se faisait dans les 3 à 24 heures après la naissance. Il démontra que cette colonisation dépendait de l'environnement ainsi que de l'alimentation du nouveau-né (Shulman et al., 2007).

Le microbiote intestinal est composé d'une variété d'archées, de champignons, de virus et de bactéries. Le composant le plus proéminent reste cependant les bactéries intestinales, avec une population allant jusqu'à  $10^{14}$  micro-organismes (Savage, 1977) par personne au sein du tube digestif, soit l'équivalent de 2kg de micro-organismes. Le microbiote intestinal est estimé de 300 à environ 40.000 espèces différentes (Eckburg et al., 2005; Frank et al., 2007; Savage, 1977) mais à l'heure actuelle aucune technique d'analyse ne permet de déterminer avec précision le nombre exact d'espèces présentes chez un individu.

Le nombre, la densité et la diversité bactérienne le long du tractus gastro-intestinal varient de la bouche au rectum (Figure 32). Au niveau de l'œsophage et de l'estomac seules  $10^1$  à  $10^3$  bactéries par millilitre sont dénombrées tandis que dans le colon, il est observé  $10^{12}$  à  $10^{14}$  bactéries par gramme de selle (Biedermann and Rogler, 2015). L'abondance et la diversité du microbiote dans

le tractus gastro-intestinal croissent positivement de l'œsophage à l'anus. Ces modifications sont possibles du fait des variations du taux d'oxygène (aérobie/anaérobie), de nutriments, du pH, de sels biliaires, du temps de transit, des composants du mucus, des cellules immunitaires, etc. (Martinez-Guryn et al., 2019).

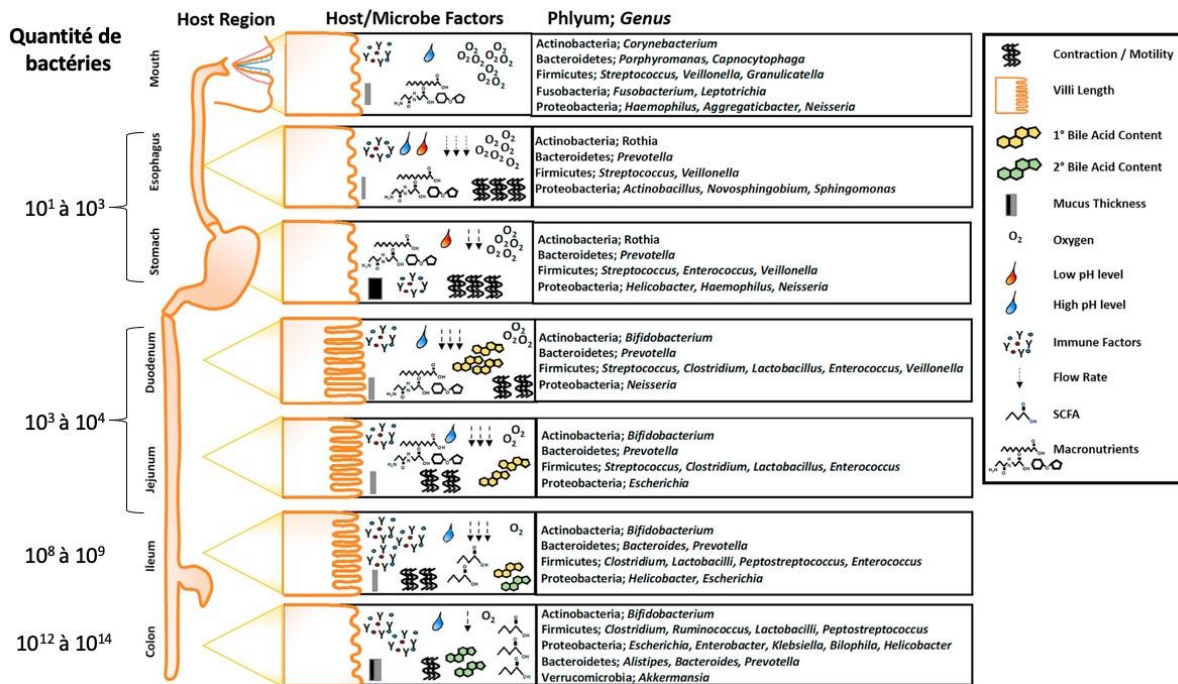


Figure 32 : Représentation des facteurs du microbiote et de l'hôte le long de l'axe gastro-intestinal. La population bactérienne augmente dans un sens rostro-caudal, de plus chaque région du tube digestif possède des phyla et genres bactériens précis. De nombreux facteurs sont libérés par l'hôte dans le lumen intestinal (acides biliaires primaires, facteurs immunitaires, etc.) ainsi que de nombreux métabolites bactériens (acides biliaires secondaires, acides gras à chaîne courte (SCFA), etc.) pouvant jouer des rôles dans la physiologie digestive de l'hôte mais également sur les populations bactériennes. Adapté de (Biedermann and Rogler, 2015; Martinez-Guryn et al., 2019).

### A. Classification du microbiote intestinal

Chez l'Homme, les phyla les plus abondants pour un individu sain sont les *Firmicutes* (79,4%), les *Bacteroidetes* (16,9%), les *Actinobacteria* (2,5%) et les *Proteobacteria* (1%) et d'autres phyla minoritaires comme les *Verrucomicrobia* (0,1%) (Tap et al., 2009). Chaque phylum est subdivisé en classe, ordre, famille, genre et espèce (Figure 33).

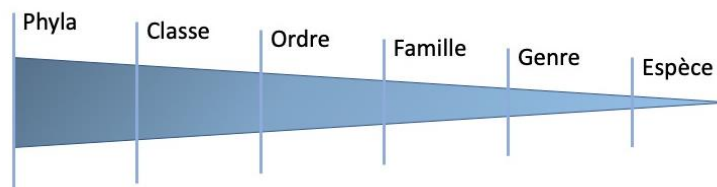


Figure 33 : Classification des bactéries. Le phylum est l'entité la plus grosse de l'arbre phylogénétique et la taille de celle-ci diminue jusqu'à atteindre l'espèce.

Le phylum le plus important est représenté par les *Firmicutes* qui sont des bactéries Gram<sup>+</sup>, incluant plus de 200 genres (Vrieze et al., 2010). Elles sont divisées en trois classes de bactéries : les *Clostridia* (anaérobie), les *Erysipelotrichia* (ou *Mollicutes*) et les *Bacilli* (aérobie stricte ou facultative) (Seong et al., 2018). Ensuite viennent les *Bacteroidetes* qui sont des bactéries Gram<sup>-</sup>,

subdivisées en quatre classes : les *Bacteroidia*, les *Cytophagia*, les *Flavobacteriia* et les *Sphingobacteriia* (Johnson et al., 2017). Les *Actinobacteria* sont des bactéries Gram<sup>+</sup> avec un haut taux de GC dans leur génome. Ce phylum est composé majoritairement de bactéries aérobies. Les *Actinobacteria* plus connues sont les bactéries anaérobies du genre *Bifidobacterium* ayant un rôle commensal dans la flore intestinale (Barka et al., 2016). Les *proteobacteria* sont des bactéries Gram<sup>-</sup>, qui contiennent de nombreuses bactéries pathogènes pour l'Homme, le genre le plus connu étant l'*Escherichia* (Rizzatti et al., 2017).

### B. Méthodes d'analyse

Il existe différentes méthodes d'analyse du microbiote intestinal, les plus anciennes sont les techniques de culture mais malheureusement celles-ci ne permettent de cultiver qu'une partie des bactéries. Ensuite sont apparues par le développement de nouvelles technologies des méthodes basées sur le génome bactérien.

#### 1. Méthode de culture

La culture bactérienne est la méthode la plus ancienne d'analyse du microbiote intestinal. Elle permet de cultiver à faible coût les bactéries et possède une bonne reproductibilité. Elle ne permet cependant pas de distinguer les groupes phylogénétiques et de cultiver plus de 20% du microbiote intestinal (Ward et al., 1990). En effet, de nombreux paramètres peuvent rendre la culture difficile à réaliser : pH, température, oxygène, présence de nutriments spécifiques, poussée lente de certaines espèces masquée par le développement rapide d'autres, etc. (Hiergeist et al., 2015). Cette technique n'est cependant pas obsolète puisqu'elle est toujours utilisée actuellement pour l'étude et la détection de bactéries antibio-résistantes (McLain et al., 2016; Sullivan et al., 2001). Récemment, une étude utilisant jusqu'à 200 conditions de culture différentes démontre que certaines souches bactériennes qui sont non détectables par une méthode de séquençage peuvent être détectées par méthode de culture, laissant apercevoir que même les techniques les plus récentes présentent des biais inhérents à la technique (Lagier et al., 2012).

#### 2. Méthode génomique

La plupart des techniques d'analyse non basées sur la culture sont liées à l'étude de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal bactérien. Cette séquence a été choisie pour plusieurs raisons : sa petite taille (environ 1,5 kb), sa forte conservation entre les espèces bactériennes permettant de les relier de façon fiable, et des zones de variations suffisantes pour mettre en évidence les relations d'évolution entre les bactéries (Peterson et al., 2008). Il existe de nombreuses techniques comme la PCR ciblée, les techniques d'empreintes telles que l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) ou l'électrophorèse sur gel en gradient de température (TGGE), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP), l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), les micropuces à ADN, le séquençage 16S, le séquençage Shotgun (Figure 34) (Fraher et al., 2012).

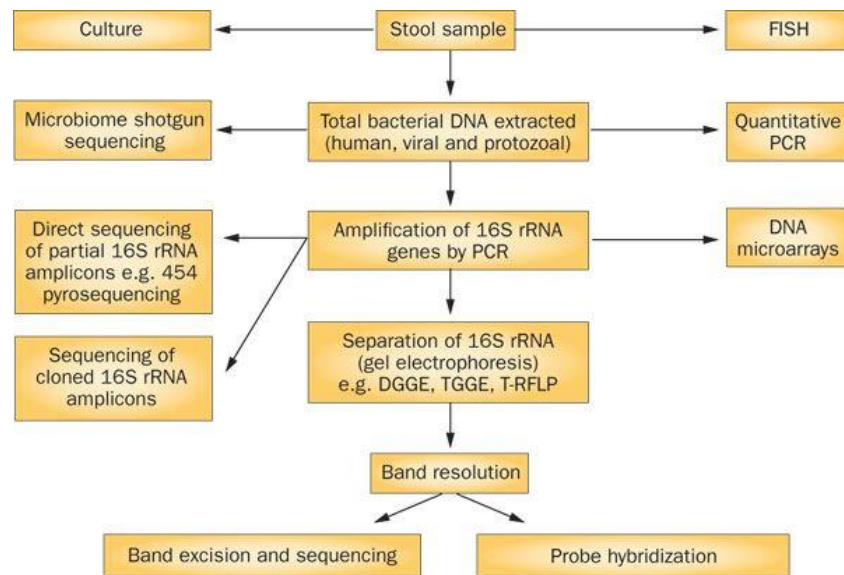


Figure 34 : Vue d'ensemble des techniques utilisées pour la caractérisation du microbiote intestinal. (Fraher et al., 2012).

Technique	Description	Avantages	Désavantages
Culture	Isolation de bactéries sur un milieu sélectif	Peu onéreux, semi quantitatif	Demande un travail important, 20% seulement des bactéries sont cultivables
qPCR	Amplification et quantification de l'ARN 16S	Identification phylogénétique, rapide et quantitatif	Présence de biais de PCR, incapacité à identifier de nouvelles espèces
DGGE/TGGE	Séparation sur gel des amplicons de l'ARN 16S en utilisant la dénaturation ou la température	Rapide, semi-quantitatif. Les bandes peuvent être découpées pour des analyses ultérieures	Pas d'identification phylogénétique, présence de biais de PCR
T-RFLP	Amplification de primers fluorescents puis utilisation d'enzymes de restriction pour la digestion des amplicons de l'ARN 16S. Séparation des fragments digérés sur gel d'électrophorèse	Peu onéreux, rapide et semi-quantitatif	Pas d'identification phylogénétique, présence de biais de PCR, faible résolution
FISH	Hybridation de sondes d'oligonucléotides fluorescentes sur les séquences de l'ARN 16S. Analyse de la fluorescence par cytométrie de flux	Identification phylogénétique, semi-quantitatif, aucun biais de PCR	Dépendant de la séquence de la sonde, incapable d'identifier de nouvelles espèces
Puce à ADN	Hybridation de sondes d'oligonucléotides sur des séquences nucléotidiques. Fluorescence détectée par un laser	Identification phylogénétique, rapide et semi-quantitatif	Hybridation de plusieurs sondes sur une cible, présence de biais de PCR, mauvaise détection des espèces en faible quantité
Séquençage 16S direct	Séquençage massif d'une partie des amplicons de l'ARN 16S	Identification phylogénétique, rapide, quantitatif, identification de bactéries inconnues	Présence de biais de PCR, onéreux, demande un travail important
Séquençage Shotgun	Séquençage massif de l'ensemble du génome	Identification phylogénétique, quantitatif	Onéreux, beaucoup d'informations à analyser à la sortie du séquençage

Tableau 2 : Techniques utilisées pour caractériser le microbiote intestinal avec leurs avantages et leurs inconvénients détaillés. D'après (Fraher et al., 2012).

Seules ces deux dernières techniques seront détaillées dans ce manuscrit.

### a. Séquençage 16S

Le séquençage est une technique de référence lorsqu'il est question d'espèces bactériennes. La méthode de Sanger utilisant l'amplification de clone de l'ARNr 16S fut l'une des premières techniques de séquençage (Sanger et al., 1977). Cette technique permettait de quantifier et d'identifier les différences phylogénétiques des bactéries intestinales, ainsi que d'observer la variabilité interindividuelle du microbiote intestinal. L'avantage de cette technique était de permettre notamment l'analyse plus aisée des bactéries non cultivables (Eckburg et al., 2005). Cependant cette technique utilisant une amplification préalable par des clones est onéreuse et chronophage pour créer suffisamment d'amplicons analysables (Rogers and Venter, 2005).

Des techniques de nouvelle génération ont peu à peu remplacé cette technique comme par exemple le Pyroséquençage 454, la technique Illumina ou SOLiD. Ces techniques permettent un séquençage massif à haut débit sur l'ARNr 16S bactérien issu directement de l'ADN sans passer par de l'amplification par clonage des ARNr 16S, évitant ainsi les biais d'amplification. Ces techniques permettent l'analyse en parallèle de plusieurs échantillons et ont l'avantage d'être plus rapides que la méthode de Sanger, permettant ainsi l'identification phylogénétique, la détection et/ou l'identification de bactéries inconnues. Ces techniques ont déjà été utilisées pour observer l'effet d'antibiotiques sur le microbiote intestinal (Dethlefsen et al., 2008) ou pour comparer le microbiote entre des patients atteints de syndrome de l'intestin irritable et des contrôles sains (Jeffery et al., 2012).

Pour déterminer la composition du microbiote intestinal, les ARNr 16S sont assemblés en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs) basées sur le pourcentage d'homologie de séquence, avec un seuil habituellement fixé à 97% d'homologie. Il est possible de détecter des différences infimes dans le pourcentage d'homologie permettant ainsi de faire l'identification phylogénétique : par exemple une homologie supérieure à 97% permet de définir que les séquences proviennent de la même espèce tandis qu'une homologie supérieure à 95% permet de dissocier deux espèces du même genre (Fraher et al., 2012; Peterson et al., 2008; Sarangi et al., 2019). Il faut cependant noter que les différentes étapes de manipulation de l'échantillon, d'extraction, d'amplification peuvent tout de même être une source de potentiels biais pour l'analyse finale.

### b. Séquençage Shotgun

La technique de Shotgun est quelque peu différente, au lieu de se concentrer sur un locus spécifique du génome tel que le gène de l'ARNr 16S, l'intégralité de l'ADN bactérien est utilisé (Sekirov et al., 2010).

L'ADN entier est fragmenté en petit morceaux qui sont intégralement et séparément séquencés pour obtenir l'information du métagénome ou microbiome entier. Cette technique fournit des millions de séquences provenant de différentes locations dans le génome de l'ADN bactérien. Cet ADN analysé ne contient pas uniquement l'information taxonomique présente dans l'ARNr 16S, mais contient également les régions codantes pour des protéines ou enzymes qui sont utilisées dans les fonctions biologiques bactériennes (Sarangi et al., 2019). Les séquences d'ADN fragmentées sont ensuite mises bout à bout pour reconstituer une séquence continue. Cette

technique a déjà été utilisée pour comparer le microbiote intestinal entre des patients atteints de la maladie de Crohn et des contrôles sains (Manichanh et al., 2006).

Cette technique permet donc d'explorer deux aspects importants du microbiote intestinal : les bactéries présentes et ce qu'elles sont capables de produire/faire (Quince et al., 2017). Malheureusement, cette technique séquence aussi l'ADN de l'hôte présent dans les selles et cela peut biaiser les résultats obtenus. Pour pallier à cette difficulté des étapes de filtration des données sont effectuées lors de l'analyse comme par exemple la suppression des lectures de séquençage du métagénome humain. Cette technique est très onéreuse et fournit une quantité d'informations importante nécessitant une analyse qui n'est malheureusement pas à la portée des laboratoires non spécialistes (Fraher et al., 2012; Sarangi et al., 2019).

### 3. *Mesure de la diversité bactérienne*

La mesure de la diversité se fait à partir de l'unité fondamentale d'analyse : l'OTU. Il existe l' $\alpha$ -diversité qui représente la diversité au sein d'une communauté caractérisée par le nombre total d'OTUs (« species richness »), l'abondance relative des OTUS (« species evenness ») ou un indice qui combine ces deux dimensions (Lozupone and Knight, 2008). Il existe plusieurs mesures de l' $\alpha$ -diversité comme les mesures qualitatives Chao1 (Chao, 1984) ou quantitatives basées sur la mesure des OTU comme l'index de Shannon ou de Simpson (Shannon, 1997; Simpson, 1949).

En parallèle, il existe la  $\beta$ -diversité qui indique la diversité dans une communauté. Elle est caractérisée par le nombre d'espèces ou OTUs partagées entre deux communautés ou groupes de personnes.

## C. Le microbiote intestinal au cours de la vie de l'hôte

### 1. *Mise en place du microbiote intestinal chez l'enfant*

Le microbiote intestinal se met en place à partir de la naissance de l'enfant. Initialement, il était considéré que la poche amniotique ainsi que le méconium présent dans le tube digestif de l'enfant durant la gestation étaient stériles. Il faut cependant savoir que certaines études montrent une pré-colonisation bactérienne par des précurseurs provenant de la mère lors de la gestation, colonisation démontrée par la présence d'ADN bactérien dans le liquide amniotique et le méconium (Collado et al., 2016; Jiménez et al., 2008). Cependant, ces études restent encore débattues dans la communauté scientifique actuelle, indiquant que l'ADN observé pourrait provenir de contaminants ou de poussières extérieures lors de l'analyse des échantillons (Lauder et al., 2016).

A la naissance, la mise en place du microbiote dépend du mode d'accouchement, de la période de gestation et du lieu d'accouchement (hôpital/maison) (Milani et al., 2017). En effet, un accouchement par voie basse permettra à l'enfant d'obtenir un microbiote intestinal ressemblant à celui de sa mère, tandis qu'un accouchement par césarienne aboutira à un microbiote moins similaire plus proche de celui de la peau (Bäckhed et al., 2015; Dominguez-Bello et al., 2010). Dans les premiers mois de vie, le microbiote intestinal dépend également du mode d'alimentation pour le nouveau-né : un allaitement maternel donnera un microbiote riche en *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* tandis qu'une alimentation par lait en poudre donnera un microbiote plus riche en *Clostridia*. Il faut noter qu'au fur et à mesure de l'évolution du nouveau-né, il sera observé une

augmentation de l' $\alpha$ -diversité et une diminution de la  $\beta$ -diversité (Figure 35) (Bäckhed et al., 2015).

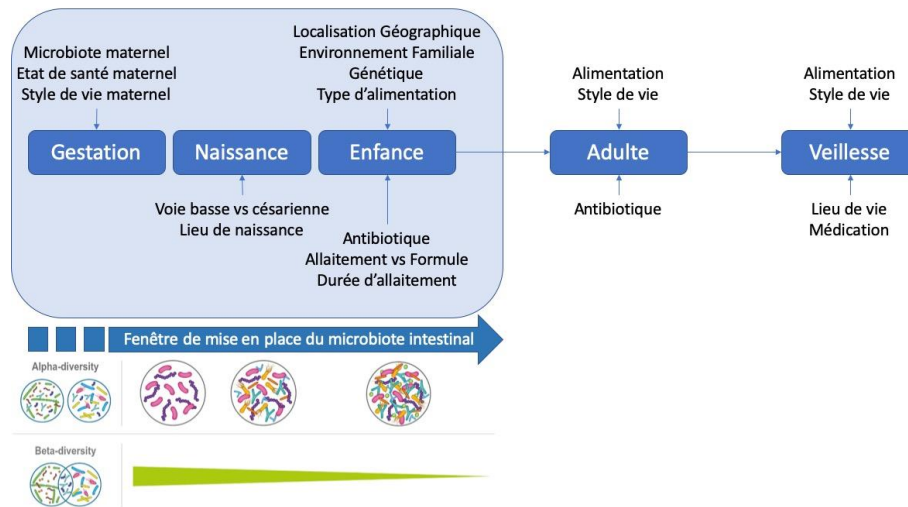


Figure 35 : **Facteurs influençant le microbiote intestinal au cours de la vie.**

Le microbiote intestinal s'installe pendant les premières années de la vie où il est possible d'observer une mise en place de l' $\alpha$ -diversité et une diminution de la  $\beta$ -diversité. Au cours de la vie d'une personne de nombreux facteurs peuvent jouer sur la composition du microbiote intestinal comme des facteurs environnementaux (alimentation, style de vie, etc.) mais également des facteurs génétiques. Adapté d'après (Derrien et al., 2019) et (Rodríguez et al., 2015).

Des étapes ou éléments-clés dans la vie de l'enfant influencent la mise en place du microbiote intestinal. Par exemple, à l'introduction des aliments solides le microbiote intestinal subit une modification majeure avec une forte augmentation de la proportion de *Bacteroidetes* (Koenig et al., 2011). La présence de frères et/ou sœurs plus âgés peut avoir un impact direct sur le microbiote du jeune enfant (Laursen et al., 2015), mais également la prise d'antibiotiques chez l'enfant, la localisation géographique, la génétique, l'alimentation, etc. (Rodríguez et al., 2015).

Il faut cependant savoir que durant les trois premières années de vie, fenêtre de temps où le microbiote définitif s'installe, une multitude de facteurs peuvent influencer sa mise en place (Figure 35). Passé ce délai le microbiote est considéré comme stable et sera similaire à celui conservé à l'âge adulte (Bergström et al., 2014; Yatsunenko et al., 2012).

## 2. Maintien du microbiote intestinal chez l'adulte

Au cours de la vie adulte, le microbiote est relativement stable et se subdivise généralement en trois entérotypes majoritaires dans la population générale : l'entérotipe 1 avec prédominance des *Bacteroides*, le type 2 avec prédominance de *Prevotella*, le type 3 avec prédominance de *Ruminococcus* (Arumugam et al., 2011). Cependant, ces entérotypes ne sont pas inchangés au cours de la vie de l'adulte. Ils peuvent être influencés par l'alimentation, la prise d'antibiotiques, la pathologie et l'âge.

L'alimentation enrichie en graisse et en sucre, aussi nommée « Western diet » pour sa localisation dans les pays occidentaux, est associée à une diminution importante de la diversité du microbiote intestinal, tandis qu'un régime plus agricole augmente la richesse des genres bactériens (De Filippo et al., 2010). Les changements dans la composition du microbiote intestinal en réponse à un changement d'habitude alimentaire peuvent s'expliquer par le fait que certaines bactéries sont



mieux équipées génétiquement pour utiliser différents substrats de l'alimentation. C'est pourquoi l'entérotipe 1 est davantage associé à un régime riche en protéines animales et en graisses, tandis que le type 2 est associé à un régime riche en fibres et faible en protéines animales (Wu et al., 2011). Cela peut notamment être observé chez des occidentaux avec un régime végétarien, le fort apport en fibres et en carbohydrates permet une plus grande production d'AGCC diminuant ainsi le pH intestinal, empêchant la croissance des bactéries pathogènes comme *E. coli* et favorisant la croissance des bactéries qui utilisent les fibres (Zimmer et al., 2012). Malheureusement cette modification de régime alimentaire chez des occidentaux n'est pas suffisante pour changer d'entérotipe, seules des modifications légères sont observées au niveau des espèces bactériennes composant leur microbiote intestinal (Wu et al., 2016).

La prise d'antibiotiques au cours de la vie de l'hôte est un facteur de modification du microbiote intestinal important. Des études montrent un changement conséquent dans la densité et la composition du microbiote intestinal chez les enfants après un traitement aux antibiotiques (Hussey et al., 2011; Palmer et al., 2007). De façon générale, tout au long de la vie, l'utilisation d'antibiotiques aboutit à une diminution de la diversité microbienne (Jernberg et al., 2010). Malheureusement, l'effet des antibiotiques ne semble pas être totalement réversible sur les populations bactériennes. En effet, il a été montré qu'après une longue période suivant l'administration des antibiotiques, certaines communautés bactériennes n'arrivaient pas à revenir à leur niveau avant traitement, voire même pouvaient disparaître définitivement de la flore intestinale (Dethlefsen and Relman, 2011; Dethlefsen et al., 2008; Jakobsson et al., 2010).

Passé l'âge de 60-65 ans, et au fur et à mesure du vieillissement, la  $\beta$ -diversité (inter-individu) augmente avec de fortes variations du microbiote intestinal et une diminution de l' $\alpha$ -diversité (Biagi et al., 2010; Claesson et al., 2011). Ces modifications peuvent venir d'une augmentation de la médication (Bartosch et al., 2004), mais également d'une physiologie digestive changeant avec l'âge aboutissant à diminution du temps de transit et des sécrétions digestives (Mariat et al., 2009; O'Toole and Jeffery, 2015).

Il faut cependant noter que le microbiote intestinal sait faire preuve de résilience (Figure 36). En effet, il possède la capacité d'assimiler des modifications provenant de son environnement et de revenir à un pseudo-état de base qui reste stable, c'est-à-dire que les changements infimes n'ont pas forcément une influence sur la composition finale du microbiote intestinal. Ce phénomène de résilience protège l'hôte de la dysbiose, un déséquilibre de la composition du microbiote intestinal pouvant aboutir à des pathologies associées non dues à une population bactérienne spécifique (Sommer et al., 2017).

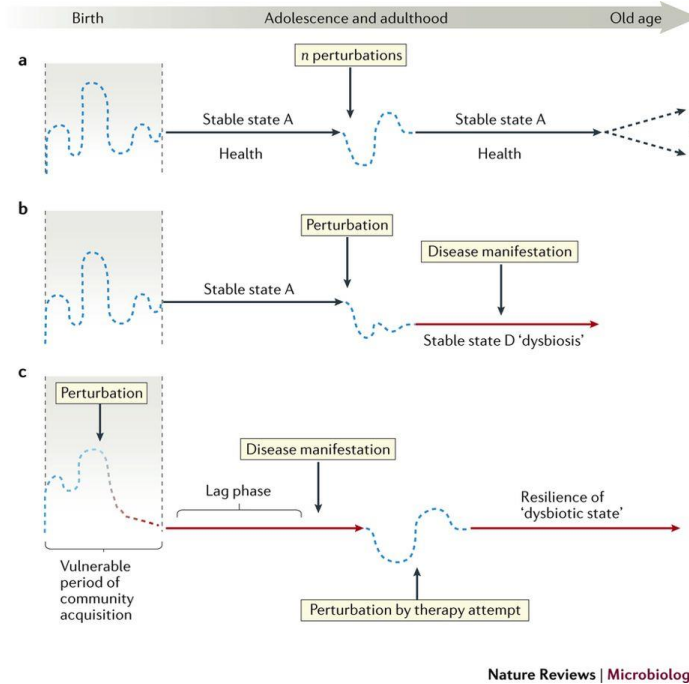


Figure 36 : Représentation schématique du phénomène de résilience du microbiote intestinal.

**a** : l'état stable est atteint durant l'adolescence (Stable state A) et est relativement stable au cours de la vie de l'hôte. Même en cas de perturbations intenses ( $n$  perturbations), le microbiote intestinal a la capacité de restaurer son état initial ; **b** : après certaines perturbations le microbiote n'est cependant pas capable de revenir à son état initial et atteint un nouvel état stable (Stable state D). Ce nouvel état représentant une dysbiose intestinale peut être associé à des pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques intestinales ; **c** : la capacité de résilience peut par moments être délétère pour l'hôte, par exemple suite à une perturbation provoquant une dysbiose lors de la mise en place du microbiote intestinal chez le jeune enfant. Malgré des perturbations dues à une thérapie pour revenir à un état stable A, la résilience du microbiote peut faire persister la dysbiose rendant difficile le retour à un état stable physiologique (Sommer et al., 2017).

## II. Le rôle du microbiote intestinal dans les grandes fonctions digestives

### A. Effets sur la motricité digestive

Le rôle du microbiote intestinal dans la motricité digestive passe principalement par la mise en place et le maintien de l'homéostasie du SNE. Ceci a été mis en évidence grâce à un modèle de souris dénuées de microbiote dites « GermFree » (GF). Il a été montré que chez ces souris déficientes en microbiote intestinal, une mauvaise mise en place du plexus myentérique dans l'intestin grêle (Figure 37), avec des ganglions entériques de taille plus petite, ainsi qu'une modification du ratio de neurones Ach/NO (Collins et al., 2014). Une équipe démontre que chez les souris GF, il est observé à quatre semaines une diminution du nombre de neurones NO<sup>+</sup> sans changement du nombre de neurones à Ach<sup>+</sup>, cela étant accompagné d'une diminution du nombre de prolongements Tuj1<sup>+</sup> (Anitha et al., 2012). Ces modifications du SNE peuvent impliquer des modifications de la physiologie digestive comme par exemple une augmentation du temps de transit (Smith et al., 2007a). Le microbiote semble jouer sur la mise en place du SNE par des mécanismes impliquant la 5-HT. Ces anomalies structurales du SNE et fonctionnelles digestives peuvent cependant être annulées avec la colonisation du tube digestif par un microbiote conventionnel dès trois jours après colonisation (De Vadder et al., 2018).

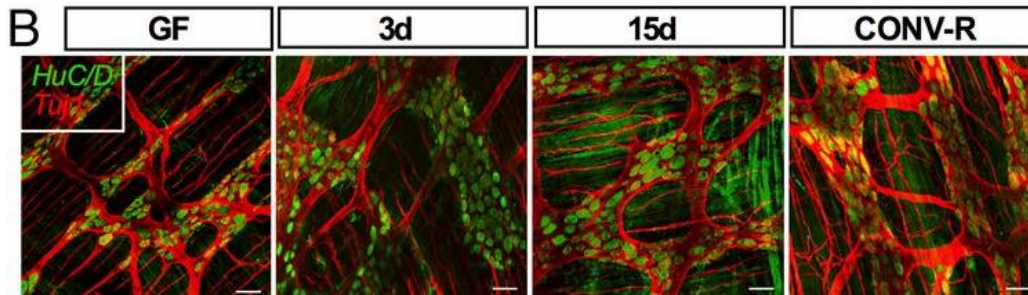


Figure 37 : *Le microbiote intestinal régule la mise en place et la fonction du système nerveux entérique.* Immunohistochimie représentative du plexus myentérique du colon de souris montrant le marqueur pan neuronal HuC/D (vert) et TuJ1 (rouge). Les souris Germ-Free ont été colonisées avec du microbiote de souris sauvages et les immunohistochimies sont réalisées avant colonisation (GF), après trois jours de colonisation (3d), après quinze jours (15d) et sur des souris sauvages (CONV-R), échelle 50  $\mu$ m (De Vadder et al., 2018).

### B. Effets sur la barrière épithéliale intestinale

Outre les différentes interactions de la BEI avec le système immunitaire et le SNE, le microbiote intestinal est capable d’agir sur les fonctions physiologiques de la BEI et peut intervenir dans le cadre de pathologies.

L’implication du microbiote intestinal dans le maintien de l’homéostasie digestive a été mise en évidence grâce à des modèles de souris GF. Il a en effet été démontré que la composition du microbiote intestinal pouvait moduler la composition du mucus intestinal, un élément important pour la protection de la BEI (Jakobsson et al., 2015). D’autre part, les souris GF ont une perméabilité paracellulaire diminuée dans le colon proximal avec une expression augmentée des marqueurs de jonctions serrées comme la claudine-1 ou l’occludine par rapport aux souris exemptes de pathogènes spécifiques (SPF) (Figure 38). Lors de l’ajout d’une flore bactérienne, ces paramètres sont rétablis à un niveau physiologique (identique aux souris SPF) seulement une semaine après la greffe (Hayes et al., 2018). De plus l’introduction d’un microbiote humain chez des souris axéniques permet d’améliorer l’intégrité de la BEI en structurant la couche de mucus et en remodelant la taille des microvillosités épithéliales.

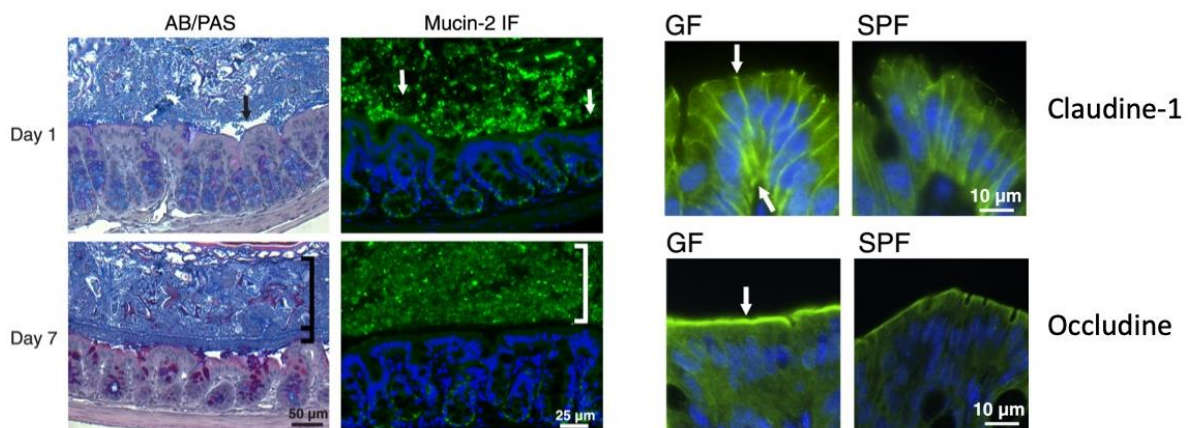


Figure 38 : *Le microbiote intestinal est indispensable à la maturation et à l’établissement de la barrière épithéliale intestinale.* Gauche : photo représentative de la structure du mucus un jour et sept jours après rétablissement du microbiote intestinal chez des souris germ-free. La structure est évaluée par le bleu alcyon et l’acide périodique Schiff (AB/PAS), et immunohistochimie de la mucine-2 (vert) et des noyaux cellulaires (bleu), échelle 25  $\mu$ m ; Droite : Immunohistochimie de la claudine-1 (haut, vert) et de l’occludine (bas, vert) chez des souris sauvages et des souris germ-free, échelle 10  $\mu$ m (Hayes et al., 2018).

### III. Les médiateurs du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est capable d'interactions directes avec l'hôte mais peut également produire des métabolites bactériens qui ont des conséquences sur la physiologie de l'hôte. De nombreux métabolites bactériens sont connus pour leurs effets dans les pathologies cardiaques, rénales ou les syndromes métaboliques tels que les polyamines, les AGCC, les sels biliaires secondaires, le triméthylamine N-oxide, les dérivés du métabolisme du tryptophane, etc (Agus et al., 2018; Li et al., 2017; Wang and Zhao, 2018). Cependant l'étude de l'implication du microbiote intestinal dans ces pathologies est récente comparativement à l'étude de son implication dans les pathologies digestives. Les métabolites majeurs ou dérivés bactériens, connus pour leurs rôles dans la régulation des fonctions de la BEI ou du SNE, sont les AGCC, les sels biliaires ou encore le LPS, malgré que ce dernier ne soit pas un métabolite bactérien à proprement parler.

#### A. Le lipopolysaccharide

Le LPS est une endotoxine dérivée de la membrane externe des bactéries Gram<sup>-</sup>. Le LPS est relâché des membranes bactériennes lors de destruction bactérienne et possède une forte capacité pro-inflammatoire. Il est capable d'agir sur les cellules par des récepteurs TLR dont les récepteur majoritaires TLR4 et TLR2 (Takeuchi et al., 1999). La réaction inflammatoire due au LPS est médiée par des cytokines pro-inflammatoires dont le TNF $\alpha$  est l'acteur majoritaire (Beutler and Rietschel, 2003).

#### B. Les acides gras à chaîne courte

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont des acides gras saturés, composés de six atomes de carbones ou moins, produits à partir de carbohydrates et provenant de la digestion par les bactéries anaérobies du tube digestif. Les AGCC majoritairement retrouvés dans le tube digestif sont l'acétate, le propionate, le butyrate et le valérate.

Les AGCC sont produits suite à la fermentation des fibres alimentaires. Leurs concentrations sont très variables le long du tube digestif et peuvent-être influencées par de nombreux facteurs comme le temps de transit, l'alimentation, l'âge, les sécrétions intestinales, etc. (Macfarlane and Macfarlane, 2003). Il faut savoir que les AGCC sont très peu retrouvés au niveau de l'intestin grêle et sont principalement présents au niveau du colon proximal de l'hôte (Cummings et al., 1987). L'acétate et le propionate sont produits majoritairement par le phylum des *Bacteroidetes* tandis que le butyrate est principalement produit par les *Firmicutes* (den Besten et al., 2013).

Les AGCC agissent directement par des récepteurs couplés à des protéines G présents tout le long du tube digestif à la surface de la BEI (Ganapathy et al., 2013) ou des cellules de l'environnement de la BEI. Il existe trois types de récepteurs majoritaires : le récepteur Gpr109 avec une affinité forte au butyrate (Cresci et al., 2010), le Gpr43 avec une affinité plus importante pour le propionate et l'acétate (Bindels et al., 2013) et le Gpr41 avec une affinité plus importante pour le propionate et le butyrate (Brown et al., 2003). Cependant la localisation des récepteurs semble être cellule-spécifique : par exemple le Gpr41 et Gpr43 sont exprimés par les cellules entéroendocrines, tandis que les neurones n'expriment que Gpr41 et les cellules immunitaires Gpr43 (Nøhr et al., 2013).

Les AGCC peuvent avoir des effets sur les cellules immunitaires au niveau de la lamina propria ou les neurones entériques sous la monocouche épithéliale. Pour agir sur ces cellules, ils doivent traverser la BEI. Il a longtemps été pensé que les AGCC diffusaient uniquement de manière passive au travers de la membrane cellulaire mais des transporteurs spécifiques leur permettant de traverser la BEI ont été identifiés : les transporteurs MCT1 et SMCT1 au niveau apical de l'épithélium, ainsi que les transporteurs MCT1 et MCT4 au niveau basolatéral de l'épithélium (Sivaprakasam et al., 2017). Au niveau du SNE, les neurones entériques expriment à leur tour le transporteurs MCT2 (Soret et al., 2010).

### 1. Implication dans la motricité digestive

Des études ont montré que les neurones entériques expriment les récepteurs aux AGCC comme le Gpr41, que ce soit les neurones du plexus myentérique ou ceux du plexus sous-muqueux (Nøhr et al., 2013). Cette étude démontre que Gpr41 est principalement exprimé dans les neurones VIP<sup>+</sup> mais une étude plus récente a démontré qu'il est également exprimé dans les neurones cholinergiques (Kaji et al., 2016).

Chaque AGCC a un effet unique sur la motricité digestive : le butyrate accélère le transit intestinal et augmente la réponse contractile *in vivo* et *ex vivo* (Richardson et al., 1991; Yajima, 1985). Le propionate peut augmenter la fréquence de contraction par l'activation des motoneurones cholinergiques (Mitsui et al., 2005a). Cet effet peut être éradiqué en présence d'acétate qui diminue la fréquence de contraction spontanée du muscle longitudinal sans faire intervenir les neurones (Mitsui et al., 2005b). La combinaison de ces trois AGCC peut avoir un effet différent en induisant une diminution de la fréquence de contraction du muscle, phénomène qui peut être bloqué par l'utilisation de tétrodontoxine (empêchant la décharge neuronale). Ceci suggère l'intervention des neurones dans ce mécanisme d'action (Ono et al., 2004). La difficulté d'identifier un rôle précis pour chaque AGCC vient du fait de l'effet concentration dépendant, ainsi que de la combinaison d'AGCC utilisée. L'effet dose-dépendant est démontré en utilisant des concentrations de propionate plus importantes qui aboutissent à une diminution de la contraction du muscle, l'effet inverse de celui observé à dose physiologique (Hurst et al., 2014).

Les AGCC sont aussi capables de modifier la proportion neuronale de codage neurochimique. En effet, la supplémentation en butyrate en concentration physiologique chez des rats permet d'augmenter la proportion de neurones cholinergiques, d'induire une augmentation de la motricité colique et de la réponse contractile suite à une stimulation électrique *in vivo*. *In vitro* et *in vivo*, le butyrate augmente la proportion de neurones cholinergiques tandis que l'acétate et le propionate n'ont pas d'effet sur la proportion de neurones cholinergiques. La proportion de nNOS n'est pas modifiée et de CGE non plus. Les AGCC sont capables d'agir comme inhibiteur des histones désacétylases (HDACs). L'inhibition des HDACs induit une expression de la ChAT, comme le butyrate inhibe l'HDAC cela peut expliquer l'observation d'une augmentation d'Ach (Soret et al., 2010).

Chez des rats, des lavements rectaux de butyrate induisent des modifications dans les proportions neurochimiques des neurones du plexus myentérique et du sous-muqueux en augmentant la proportion de neurones cholinergiques et de neurones NO<sup>+</sup> au niveau du colon

distal (Suply et al., 2012). Cela étant accompagné d'une augmentation de la motricité colique chez les rats. Ce résultat concernant les proportions de neurones NO<sup>+</sup> est contraire à l'étude précédente, mais cela peut s'expliquer par un effet pro-prolifératif du butyrate sur les progéniteurs neuronaux, phénomène démontré au niveau du SNC (Kim et al., 2009).

Le butyrate est donc capable d'influencer le développement des neurones entériques mais peut aussi avoir une action sur les CGE présentes au niveau du SNE. En effet, au cours du développement, une forte augmentation de la concentration en butyrate au niveau intra-luminal est observée, associée à des modifications de la flore intestinale. Le butyrate inhibe la prolifération des CGE en empêchant les cellules de rentrer en phase S du cycle cellulaire. Cet effet est inhibé par l'utilisation d'un bloqueur de l'inhibition d'HDAC, indiquant que l'effet antiprolifératif sur les CGE viendrait de l'inhibition de HDAC (Cossais et al., 2016).

Le butyrate est également capable de modifier les sécrétions des CGE en stimulant la sécrétion de NGF par les CGE. Ceci a été démontré dans un modèle animal de colite, où la surexpression de NGF par les CGE suite à l'application de butyrate joue un rôle dans l'hyper-sensitivité viscérale (Long et al., 2018).

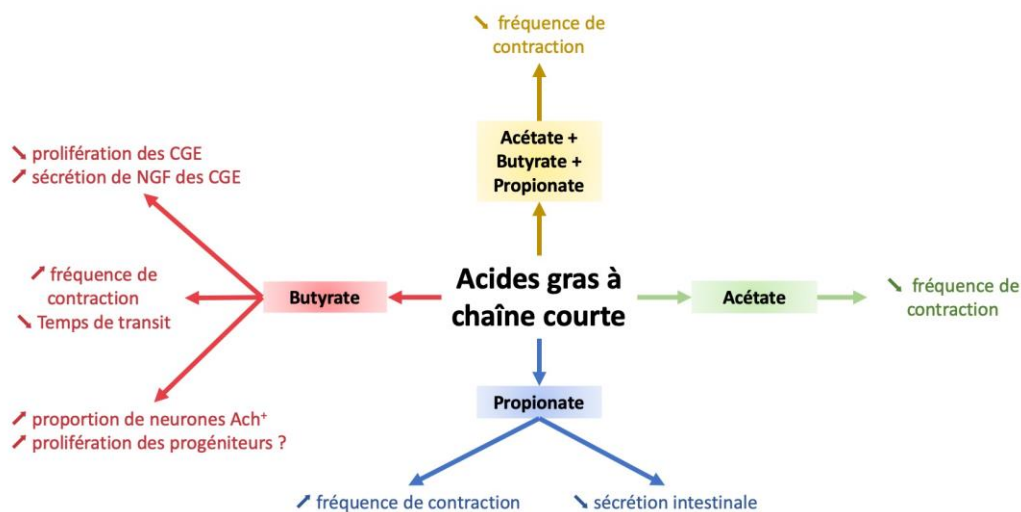


Figure 39 : Représentation schématique des effets des acides gras à chaîne courte à dose physiologique sur le système nerveux entérique.

## 2. Implication dans la perméabilité digestive

Parmi les différents AGCC, le butyrate est le plus étudié dans le cadre de la fonction de barrière, mais l'acétate et le propionate sont également responsables de réponses physiologiques.

Tout d'abord, les AGCC peuvent influencer la prolifération cellulaire des CEI. Cela a été démontré dans un modèle de souris GF où les CEI ont une prolifération réduite et un renouvellement diminué. Lors de l'injection d'AGCC (acétate, propionate et butyrate combinés) chez ces souris, il est mis en évidence une prolifération accrue avec un renouvellement davantage physiologique des composants de la BEI (Park et al., 2016). D'un autre côté, le butyrate plus spécifiquement semble avoir un effet sur les cellules souches épithéliales en inhibant leur prolifération, et en retardant les mécanismes de réparation de la barrière par l'activation de facteurs de transcription (Kaiko et al., 2016). La concentration du butyrate est cependant très peu

élevée dans le fond des cryptes comparativement au lumen central, ce qui protège les cellules souches de l'effet de celui-ci. Les AGCC ont donc des effets cellules-spécifiques et le gradient intra-luminal est important pour une bonne homéostasie digestive.

A l'opposé, les AGCC suppriment la prolifération des cellules cancéreuses et induisent l'apoptose de ces cellules (Matthews et al., 2012). Il faut cependant noter que les AGCC n'ont pas cet effet sur les CEI saines. Ce mécanisme est possible du fait que les CEI saines peuvent utiliser le butyrate comme substrat d'énergie tandis que les cellules cancéreuses préfèrent métaboliser du glucose. Dans les cellules cancéreuses, le butyrate s'accumule dans le noyau et agit comme inhibiteur des HDACs à forte concentration, un mécanisme ayant un effet anticancéreux, antiprolifératif et pro-apoptotique (Donohoe et al., 2012).

De plus, les AGCC sont impliqués dans les phénomènes de régulation de la BEI. L'effet du butyrate sur la fonction de barrière semble passer par le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  car en l'absence de ce facteur de transcription, le butyrate n'est plus capable de restaurer la perméabilité d'un modèle de CEI *in vitro* (Kelly et al., 2015). Cet effet est également retrouvé *in vivo* dans un modèle de colite infecté à *C. difficile*. Dans ce modèle, suite au traitement avec du butyrate, il est observé une amélioration de la fonction de barrière aboutissant à un rétablissement physiologique des protéines de barrière et une diminution de la perméabilité intestinale. Ces mécanismes de rétablissement des fonctions de la BEI passent également par le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Fachi et al., 2019). De nombreuses études soutiennent le rôle protecteur du butyrate à concentration physiologique et sa capacité à améliorer la fonction de barrière de la muqueuse intestinale en induisant l'expression de gènes de jonctions serrées, ou en protégeant contre l'inflammation (Wang et al., 2012a; Yan and Ajuwon, 2017). Néanmoins, le butyrate n'est pas le seul à avoir cet effet bénéfique sur le renforcement de la barrière, l'acétate et le propionate, seuls ou en combinaison avec les autres AGCC, sont capables d'augmenter la résistance transépithéliale et de modifier l'expression des molécules de jonctions serrées (Feng et al., 2018). *A contrario*, une concentration trop élevée en butyrate peut être délétère pour la BEI et donne lieu à une augmentation de la perméabilité (Peng et al., 2007).

De plus, les AGCC participent à la protection des CEI contre les pathogènes intra-luminaux. Ils peuvent donc participer à la production d'AMPs par les CEI mais les mécanismes par lesquels ils participent sont encore peu compris. Lors de la délétion d'un sous-type de récepteur aux AGCC, le Gpr43, l'activation de la voie des AMPs RegIII $\gamma$  et défensines est déficiente laissant sous-entendre que les AGCC ont une implication dans la formation de ces AMPs (Zhao et al., 2018). Ensuite, les AGCC, et plus particulièrement l'acétate, peuvent participer à la protection de la BEI par la stimulation de la sécrétion d'immunoglobulines A. Il a été montré chez des souris sauvages que l'ajout d'acétate dans leur alimentation permet l'augmentation de la production d'immunoglobulines A, connues pour leurs rôles antimicrobiens au niveau de la BEI. Cet effet n'est cependant pas retrouvé lors de l'implémentation par du butyrate seul. Cette équipe a aussi démontré que ce mécanisme passe par une voie Gpr43 dépendante puisque lors d'application d'acétate sur des souris Gpr43<sup>-/-</sup> les effets ne sont plus observés (Wu et al., 2017b). Par ailleurs, les AGCC sont capables de stimuler la production de mucus par les cellules caliciformes. En effet,

l'administration de butyrate n'augmente pas uniquement la production de MUC2, mais aussi celle de MUC1, MUC3, MUC4 (Burger-van Paassen et al., 2009; Gaudier et al., 2009).

Les AGCC luminaux sont également connus pour stimuler la sécrétion d'anion au niveau du lumen intestinal par une voie cholinergique (Kaji et al., 2016). Ils peuvent cependant moduler leurs propres effets : par exemple le propionate capable d'activer le récepteur Gpr41 et Gpr43 peut posséder un rôle anti-sécrétoire. Il a été montré que l'application de propionate en basolatéral active le récepteur Gpr41 et diminue la sécrétion d'anion au niveau du lumen intestinal en modulant la voie cholinergique (Kaji et al., 2016) ou potentiellement par une modulation du relargage du VIP (Tough et al., 2018).

Ensuite les AGCC servent de source d'énergie pour les CEI : l'oxygène consommé par ces cellules provient du phénomène d'oxydation du butyrate (Roediger, 1980). Dans le même but, les AGCC exercent un phénomène de vasodilatation permettant d'augmenter l'apport d'oxygène aux CEI grâce à une augmentation du flux sanguin (Mortensen et al., 1990, 1991).

De plus, les AGCC ont des effets anti-inflammatoires grâce à l'inhibition des HDACs et l'activation des récepteurs Gpr présents sur les CEI et les cellules immunitaires. Les AGCC peuvent ainsi diminuer le stress oxydatif, mécanisme démontré suite à l'application d'un cocktail d'AGCC (acétate, propionate, butyrate) sur des CEI *in vitro* où les dommages dus au stress oxydatif sont beaucoup moins importants (Rosignoli et al., 2001). Des études sur des modèles animaux ont appuyé le rôle anti-inflammatoire du butyrate. Dans un modèle de souris colite au dextran sulfate sodium délété en récepteur Gpr43 et Gpr109A, les souris développent une colite beaucoup plus importante en absence de ces récepteurs (Maslowski et al., 2009). Dans le modèle classique de colite au dextran sulfate sodium, il a été montré une amélioration du score d'intégrité de la BEI et une augmentation du ratio des cytokines anti/pro-inflammatoires après un traitement au butyrate (Lee et al., 2017a; Simeoli et al., 2017).

D'autre part, les AGCC peuvent agir directement *via* les cellules immunitaires en supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-12 et augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, ou encore en diminuant l'infiltration des lymphocytes dans la muqueuse intestinale (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013).

Pour finir, les AGCC ont la capacité d'inhiber l'activité de la HDAC à forte concentration et donc de favoriser l'acétylation des histones. Cette inhibition permet la diminution de la prolifération des cellules cancéreuses et de la réponse inflammatoire (par l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B), ainsi que l'induction de la différenciation cellulaire. L'ensemble de ces réactions contribuant à l'homéostasie digestive (Candido et al., 1978; Chang et al., 2014; Davie, 2003; Segain et al., 2000). Le butyrate et le propionate sont connus pour être des inhibiteurs des HDACs, tandis que l'acétate n'a aucun effet notable (Johnstone, 2002). Le butyrate est aussi capable de bloquer l'activation de la voie pro-inflammatoire du NF- $\kappa$ B dans des cellules cancéreuses, par l'activation du récepteur Gpr109A *in vitro* et *ex vivo*, aboutissant à une diminution de la régulation des facteurs



anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et une activation des signaux de mort dans ces cellules (Thangaraju et al., 2009).

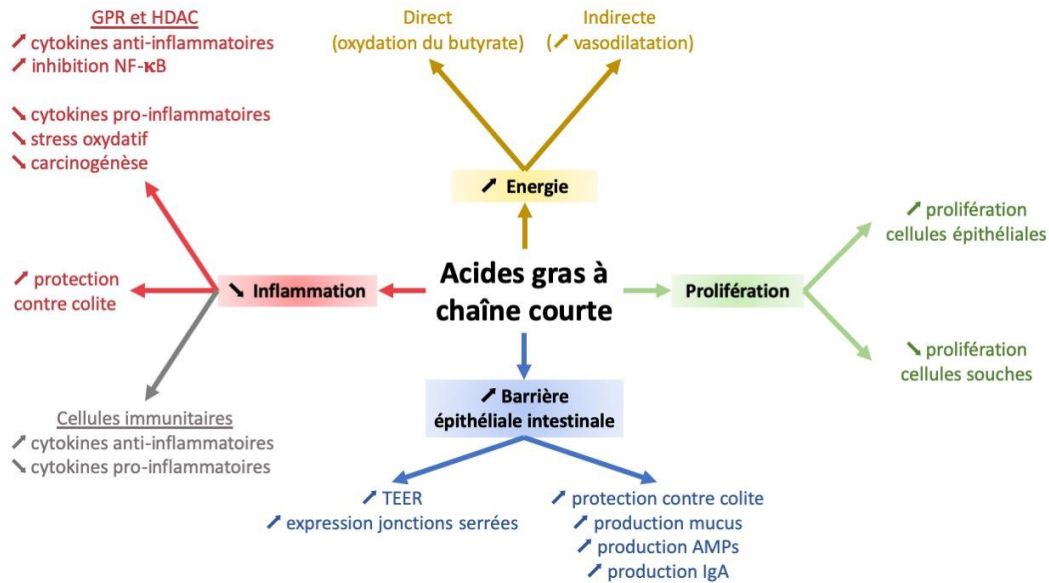


Figure 40 : Représentation schématique des effets des acides gras à chaîne courte à dose physiologique sur les cellules épithéliales intestinales.

### C. Les sels biliaires

Les sels biliaires sont synthétisés au niveau du foie par les hépatocytes grâce à l'oxydation du cholestérol par la voie du cytochrome P450. Cette voie de synthèse est nommée la voie classique de la production des sels biliaires primaires : l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) (Figure 41). Cependant cette voie n'est pas la seule permettant la production des sels biliaires, il existe des voies secondaires qui restent malgré tout mineures. Les sels biliaires primaires sont conjugués à de la glycine (majoritairement chez l'Homme) ou taurine (majoritairement chez le modèle murin) dans le foie et sont transportés pour stockage au niveau de la vésicule biliaire (Li and Chiang, 2014). Après l'ingestion d'un repas, les cellules entérochromaffines duodénales sécrètent la cholécystokinine permettant la contraction de la vésicule biliaire et donc le relargage des sels biliaires primaires dans le lumen intestinal. Outre la proportion réabsorbée par l'hôte dans l'intestin grêle (environ 85% des sels biliaires primaires), ces sels biliaires primaires sont métabolisés par le microbiote intestinal pour donner des sels biliaires secondaires non conjugués : l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA) qui sont hydrophobes (Figure 41). A partir du LCA peut être produit de l'acide ursodésoxycholique (UDCA), un sel biliaire davantage hydrophile. Environ 50% du DCA produit, une partie du LCA et de l'UDCA sont réabsorbés pour retourner dans le foie afin d'être reconjugués et sulfatés, permettant leur élimination par le système urinaire ou fécal. Au total, seuls 5% des sels biliaires seront retrouvés dans les selles, la plupart retournant dans le cycle entéro-hépatique (González-Regueiro et al., 2017).

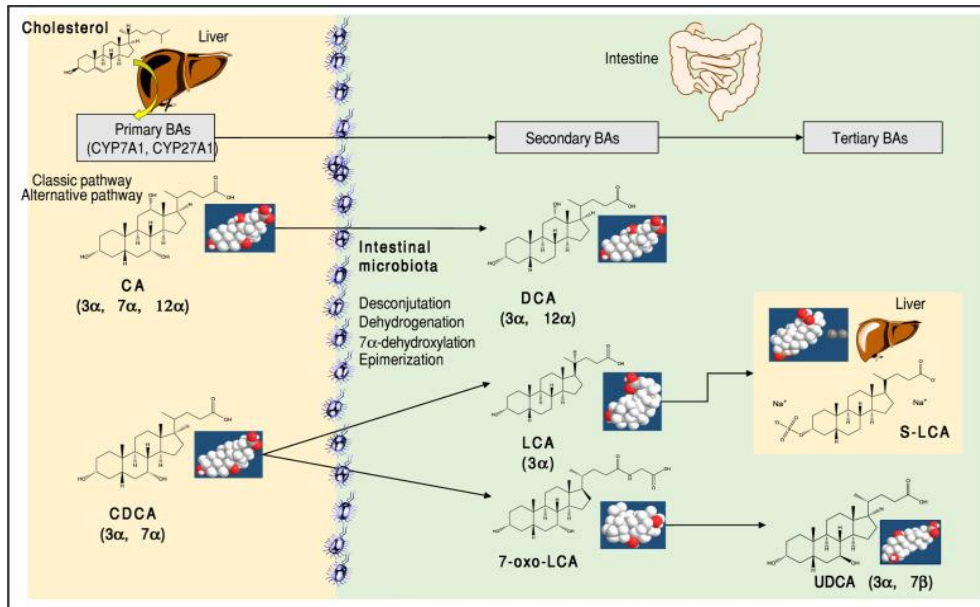


Figure 41 : **Sels biliaires primaires, secondaires et tertiaires chez l'Homme.**

Les sels biliaires primaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol par la voie classique (CYP7A1) ou les voies accessoires (CYP27A1). Les sels biliaires primaires sont l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA). Une fois libérés dans l'intestin, le microbiote intestinal déconjugue et métabolise les sels biliaires primaires en sels biliaires secondaires : le CA en acide désoxycholique (DCA), et le CDCA en acide lithocholique (LCA) qui peut ensuite être métabolisé en acide ursodésoxycholique (UDCA) (Di Ciaula et al., 2017).

Ces sels biliaires secondaires peuvent agir sur le tube digestif par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques présents tout le long du tube digestif. Le récepteur TGR5 est un récepteur couplé à une protéine G qui une fois activé donne lieu à une cascade de signalisation cellulaire via l'augmentation d'AMPC intracellulaire (Guo et al., 2016). Ce récepteur est plus affiné pour le LCA et le DCA mais peut fixer les autres sels biliaires avec une affinité moins importante (Kawamata et al., 2003). Le deuxième récepteur connu est le récepteur FXR (Makishima et al., 1999) localisé au niveau du noyau des cellules. Une fois activé, il permet la régulation de la transcription des gènes cibles. Ce récepteur est quant à lui plus affiné pour le DCA et le LCA, mais peut également fixé le CA (Martinot et al., 2017).

### 1. Implication dans la motricité digestive

A l'heure actuelle, peu de données existent concernant l'effet des sels biliaires secondaires sur les neurones entériques.

Initialement, l'effet des sels biliaires sur les neurones entériques a été mis en évidence de façon indirecte. Il a été observé suite au traitement à forte dose de DCA, une augmentation de la perméabilité intestinale au niveau du colon proximal et distal. Une inhibition locale du plexus myentérique par de la lidocaïne aboutie à une diminution de la perméabilité au niveau du colon proximal suggérant une implication du SNE dans les mécanismes de perméabilité induits par le DCA (Sun, 2004). Cette hypothèse fut par ailleurs discutée par la suite, une étude montrant que l'effet observé sur la perméabilité pouvait être en partie régulé par une action neuronale, mais provenait majoritairement d'un dommage de la monocouche épithéliale (Forsgård et al., 2014).

Une équipe démontra que les neurones entériques expriment le récepteur TGR5 au niveau du plexus myentérique et sous-muqueux. Les neurones exprimant ce récepteur sont principalement

mais pas uniquement NO<sup>+</sup> au niveau du plexus myentérique, et cholinergiques au niveau du plexus sous-muqueux. Ce récepteur TGR5 est par ailleurs retrouvé sur les IPANs. L'activation spécifique de ce récepteur par un agoniste induit une diminution de la motricité et un temps de transit accru, mécanisme médié par la voie nitrergique du plexus myentérique. Ceci pourrait potentiellement induire une sécrétion de fluide et mucus au niveau de la BEI, mécanisme médié majoritairement par la voie cholinergique (Poole et al., 2010). Renforçant l'hypothèse de l'implication des sels biliaires dans la motricité digestive, la même équipe démontra que le DCA se fixant sur le TGR5 induit effectivement une inhibition motrice due au relargage de NO, effet non retrouvé lors de l'application de DCA chez des souris TGR5<sup>-/-</sup> (Alemi et al., 2013). L'application au niveau de la muqueuse de DCA (et de LCA) stimule le péristaltisme en contractant le tube au niveau oral et en le relaxant au niveau aboral. Cette équipe propose le schéma suivant : le DCA active le récepteur TGR5 sur les cellules entérochromaffines ou les IPANs qui libèrent ensuite de la 5-HT pour induire le réflexe péristaltique. L'équipe met également en évidence que le niveau d'expression du TGR5 détermine en partie le temps de transit et la fréquence de la défécation : le temps de transit étant 1,4 fois diminué avec une diminution de la fréquence de défécation chez les souris TGR5<sup>-/-</sup> comparativement à des souris sauvages, tandis qu'une surexpression de TGR5 accélère le temps de transit de 2,2 fois avec une augmentation de la fréquence de défécation (Alemi et al., 2013). Le récepteur TGR5 pourrait être impliqué dans les pathologies digestives humaines puisque des variations génétiques de ce récepteur chez l'Homme semblent contribuer en partie au problème de transit dans les syndromes de l'intestin irritable (Camilleri et al., 2011).

### 2. Implication dans la perméabilité digestive

Les sels biliaires secondaires peuvent agir sur les deux rôles clefs de la BEI : le transport d'électrolytes et la fonction de barrière contre les pathogènes.

Au sujet du transport des électrolytes, les sels biliaires présentent un effet dose-dépendant qui doit être dénoté. En effet, chez des volontaires sains, lors d'instillation dans le colon de fortes concentrations de sels biliaires, similaires à celles retrouvées en condition pathologique, il est observé une augmentation des sécrétions par les CEI (Mekjian et al., 1971). Cela est dû à l'inhibition de l'absorption de sodium et la stimulation de sécrétion de chlore (Binder and Rawlins, 1973; Gordon et al., 1979). A l'inverse, une dose physiologique n'a que très peu d'effet sur les phénomènes de sécrétion, renforçant l'idée de dose-dépendance (Saunders et al., 1975). Des études plus récentes montrent que des doses physiologiques des sels biliaires, et plus précisément du DCA seul, inhibent la sécrétion épithéliale (Keating et al., 2009) en passant par des mécanismes impliquant le récepteur FXR (Mroz et al., 2014).

D'un autre côté, les sels biliaires sont des régulateurs de l'expression des protéines de jonctions serrées et de la perméabilité intestinale. Cet effet est médié par le récepteur FXR mais aussi par le récepteur TGR5, implications démontrées par des modèles *in vivo*. Effectivement, des rats ayant un récepteur FXR dysfonctionnel ont une perméabilité intestinale augmentée par rapport à des animaux contrôles. Cet effet est inversé suite à l'ingestion d'un agoniste spécifique des FXR diminuant la perméabilité intestinale et augmentant l'expression des protéines de jonctions serrées claudine-1 et occludine (Verbeke et al., 2015). D'autres travaux renforcent cette observation avec l'utilisation de souris déficientes en TGR5 qui ont des altérations de l'expression de ZO-1 et de

l'occludine associées à une augmentation de la perméabilité intestinale (Cipriani et al., 2011). Cette altération de la BEI pourrait provenir d'un phénotype inflammatoire, phénomène souvent associé à des altérations de la BEI. En effet, les sels biliaires sont connus pour modifier l'environnement de la BEI par la régulation de cytokines pro/anti-inflammatoires. Cette régulation reste cependant dépendante du sel biliaire utilisé (Martínez-Moya et al., 2013; Mühlbauer et al., 2004). Ces études sous-entendent donc un rôle des sels biliaires dans la modulation des mécanismes de perméabilité intestinale.

De plus, les sels biliaires sont capables de renforcer les rôles de barrière et de protection de la muqueuse intestinale contre les pathogènes. Cela a été montré par l'induction de l'expression de la protéine mucine-2 par les sels biliaires, un composant majoritaire du mucus intestinal, (Li et al., 2015). Ce phénomène de sécrétion du mucus passe par l'activation des voies de signalisation EGFR/ERK et la voie PI3K/NF- $\kappa$ B (Lee et al., 2010). Ces voies de signalisation suite à l'activation des récepteurs aux sels biliaires sont notamment impliquées dans les phénomènes de prolifération et survie des CEI. L'hypothèse de la sécrétion de mucus et d'électrolytes suite à la stimulation des neurones cholinergiques par un agoniste du récepteur TGR5 est également discutée. Une étude a montré sur des colons dénués de système nerveux et incubés avec de la tétrodontoxine (bloqueur des neurones cholinergiques) que la sécrétion luminale suite à une stimulation au TGR5 n'était pas modifiée. Ces résultats indiquent que la sécrétion de fluide au niveau de la muqueuse par la voie du TGR5 n'est pas dépendante du SNE (Ward et al., 2013).

Effectivement, le DCA à une concentration dite physiologique est capable d'activer la prolifération cellulaire des CEI *via* le recrutement du récepteur à l'EGF, donnant lieu à une activation de la voie ERK et aboutissant à un effet terminal pro-mitotique (Cheng and Raufman, 2005). Cependant l'effet prolifératif des sels biliaires ne passe pas uniquement par cette voie : il a été montré que suite à l'activation de la voie de la PKC, il est observé une augmentation de la prolifération des CEI (Shah et al., 2005). Cette voie peut être activée à la suite de l'interaction avec l'EGFr ou directement par des perturbations de la membrane plasmique (Akare and Martinez, 2005). A l'opposé, une forte concentration de sels biliaires secondaires peut aboutir à un effet antiprolifératif notamment *via* l'activation du FXR et l'inactivation de la voie de l'EGFr (Dossa et al., 2016).

Ces résultats indiquent que l'implication des sels biliaires dans la prolifération des CEI est complexe et dépend fortement du contexte de l'étude. Cette complexité d'action est également retrouvée dans l'étude des effets pro/anti-apoptotiques des sels biliaires sur les CEI. L'apoptose des CEI apparaît normalement suite à un stress cellulaire induit par du stress oxydatif, des facteurs inflammatoires, etc. L'activation du récepteur FXR promeut l'apoptose (Modica et al., 2010) tandis que l'activation du récepteur TGR5 protège l'épithélium digestif de l'apoptose (Duboc et al., 2014). Beaucoup d'études utilisent une forte concentration de sels biliaires, à un niveau physiopathologique, montrant une augmentation de l'apoptose associée à une perte de l'intégrité de la BEI. Cependant des effets complètement opposés sont observés pour des plus faibles doses, proches de la dose physiologique (Barrasa et al., 2013). Par ailleurs, l'effet des sels biliaires dépend aussi de leur hydrophobicité, il est possible de dire que les sels biliaires hydrophobes

(DCA/LCA/CDCA) sont davantage pré-apoptotiques, tandis que les hydrophiles (UDCA) sont anti-apoptotiques (Barrasa et al., 2013; Stenman et al., 2013).

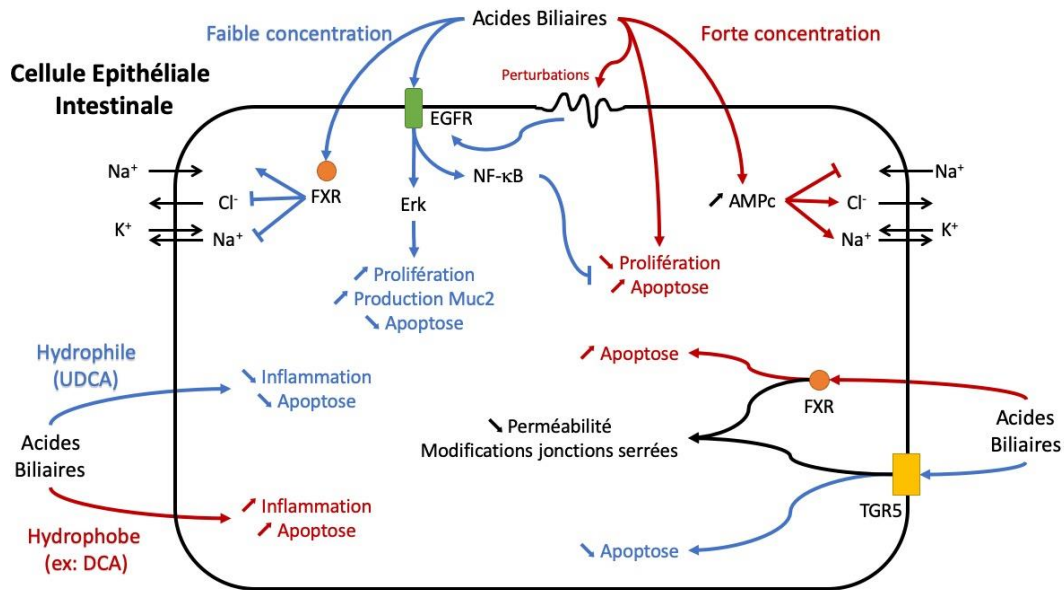


Figure 42 : Représentation schématique des effets des sels biliaires secondaires sur les cellules épithéliales intestinales.

De manière générale l'exposition des CEI aux sels biliaires peut influencer la prolifération, la survie/mort cellulaire ainsi que l'intégrité de la BEI de façon dépendante selon de multiples facteurs (dose/hydrophobicité/sels biliaires/récepteurs activés, etc.).

## Les troubles du spectre autistique

### I. Généralités

La première description de l'autisme a eu lieu en 1943 par Léo Kanner qui observa des enfants avec des comportements radicalement différents des comportements d'enfants au développement typique. Il décrit ainsi un groupe d'enfants avec des retards mentaux, mais également avec des QI normaux ou supérieurs qui ont un comportement solitaire accompagné de troubles du langage. Ces enfants avaient d'excellentes relations à l'objet, notamment lors d'une interaction avec une personne où l'objet est utilisé comme un intermédiaire de communication. L'activité des enfants décrits est en permanence régit par le besoin de solitude et de comportements répétitifs, pouvant aller jusqu'à ce que Kanner définît comme une obsession. Il indique que la société doit assumer ces enfants qui doivent arriver dans un monde sans l'habilité innée de former des contacts usuels avec d'autres personnes (Kanner, 1943).

En parallèle des travaux de Kanner, Hans Asperger décrivit le comportement de quatre enfants, tous des garçons à l'intelligence élevée caractérisée par des compétences importantes dans des domaines spécifiques d'intérêt (Asperger, 1944; Baron-Cohen, 2015). Ces enfants n'avaient cependant pas de trouble du langage ou de déficience intellectuelle. Les deux études ont été réalisées à la même époque, mais les travaux d'Asperger furent cependant moins connus dans les années 40 du fait de la publication en allemand de ses travaux. Il fallut attendre un papier de 1981

qui repris ses travaux en anglais pour que ceux-ci soit connus mondialement et que le syndrome d'Asperger soit évoqué (Wing, 1981).

La notion d'autisme fût initialement ajoutée dans le Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-III (DSM-III) (APA, 1985) nécessitant de remplir six critères distincts pour pouvoir être diagnostiqué comme autiste. Avec l'évolution des pratiques, le DSM-IV (APA, 1998) subdivisa l'autisme en deux syndromes : le syndrome d'Asperger et les troubles envahissants du développement. Cependant, au fur et à mesure de l'avancée des diagnostics et de la société, le terme autisme disparu dans le DSM-V (APA, 2013) pour la dénomination de « troubles du spectre autistique » regroupant l'ensemble du spectre hétérogène de cette condition psychiatrique (Kenny et al., 2016). De nos jours la prévalence de la pathologie en Asie, Europe et Amérique du nord est de 1 à 2% avec une augmentation au cours du temps : par exemple pour les États-Unis la prévalence en 2014 était de 1,7% alors qu'en 2000 elle n'était que de 0,7% (CDC, 2019). Le changement de la définition de la pathologie des TSA et l'amélioration des techniques de diagnostic jouent beaucoup dans l'augmentation de cette prévalence.

### A. Diagnostic

Le diagnostic de l'autisme se fait majoritairement par les critères indiqués dans le DSM-V. Il existe cinq critères à remplir pour le diagnostic des TSA (APA, 2013) :

- Le critère A regroupe les déficits en communication et en interactions sociales. Le patient doit répondre à l'ensemble des éléments suivants : déficits dans la réciprocité socio-affective, déficits dans les comportements de communication non verbale utilisés pour une interaction sociale, déficits dans le développement, le maintien et la compréhension des relations.
- Le critère B regroupe les motifs de comportements répétitifs, restreints concernant les activités ou centres d'intérêts. Le patient doit répondre à au moins deux des quatre éléments suivants : stéréotypies ou mouvements moteurs, parole, utilisation d'objet répétitive, adhérence excessive à la routine et au rituel avec résistance au changement, intérêt très restreint sur certains sujets avec une intensité ou un focus excessif, hyper ou hypoactivité aux stimuli sensoriels ou environnementaux.
- Le critère C indique que les symptômes doivent être présents au début de la période de développement.
- Le critère D indique que les symptômes doivent entraîner des déficits dans les domaines sociaux, professionnels ou dans les domaines importants du fonctionnement de la personne.
- Le critère E indique que ces troubles ne s'expliquent ni par un retard mental ni par une déficience intellectuelle.

Par la suite, il existe de nombreuses échelles d'évaluation du score de TSA, seules quelques-unes seront explicitées dans ce manuscrit : la SRS, ADI-R, ADOS, CARS-2.

La Social Responsiveness Scale (SRS) est un questionnaire de 65 questions complété par les parents, l'enseignant, un proche ou ami. Chaque item peut être répondu par un score allant de 1 à 4 (faux, parfois vrai, souvent vrai, toujours vrai) (Thabtah and Peebles, 2019). En 2012, la SRS a

été mise à jour en SRS-2 pour ajouter d'autres questions sur la communication, les relations et les comportements stéréotypés permettant ainsi d'obtenir trois formats : pour les enfants avant scolarisation (0-4 ans), enfants/adolescents scolarisés (4-18 ans) et adultes (19-89 ans). La version pour adulte inclus également un auto-questionnaire. A la fin du test, un score est établi et permet d'évaluer le trouble : un score supérieur à 76 indique une forme de TSA sévère, de 66 à 75 une forme modérée, de 60 à 65 une forme légère et un score inférieur à 59 pour une personne neurotypique (Bruni, 2014).

L'ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised) est un questionnaire sous forme d'entretien structuré qui porte sur les modalités relationnelles et comportementales dans l'enfance. Il recueille des informations sur la réciprocité des interactions sociales, la communication, le langage, les comportements stéréotypés et répétitifs. Il doit se faire avec les parents ou proches de l'enfant qui le fréquentent quotidiennement ou l'adulte directement. Cette évaluation utilise un système de score allant de 0 (réponse normale) à 2 (réponse anormale définie). Le test permet d'établir *via* un algorithme un score définissant si le patient est atteint de TSA ou non (Lord et al., 1994).

L'ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule) est un entretien semi-structuré avec le patient et qui consiste à lui faire réaliser un certain nombre de tâches (construction, description, narration, jeux, faire semblant), à observer la qualité des réponses et des interactions sociales réciproques. Il est davantage porté sur la communication et l'interaction sociale (Lord et al., 1989). Il permet d'évaluer chaque point selon une note allant de 0 (réponse normale) à 2 (réponse anormale définie). Initialement, la limite pour le diagnostic d'un TSA était de 6 points pour l'interaction sociale réciproque, de 4 points pour la communication/langage et de 2 points pour les comportements stéréotypés. Suite à une mise à jour de l'échelle (ADOS-2), elle est composée actuellement de 4 modules qui dépendent de l'âge du patient, sachant que seul un module est passé à un moment donné : module 1 pour jeunes enfants sans langage, module 2 pour enfants avec langage simple, module 3 pour enfants ou adolescents avec langage fluide, module 4 pour adolescents/adultes (Lord et al., 2000).

Le CARS (Childhood Autism Rating Scale) est un entretien semi-structuré adapté aux plus jeunes enfants (2 à 6 ans) (Schopler et al., 1980). La version actualisée (CARS-2), permettant d'évaluer les enfants jusqu'à 13 ans, comprend une quinzaine d'items d'évaluation. Il permet d'évaluer différents domaines qui peuvent être atteints comme les relations sociales, l'adaptation au changement, la communication verbale et non verbale, l'utilisation du corps de l'autre, l'utilisation d'objets, l'investissement sensoriel, l'imitation, la réponse émotionnelle, le niveau d'activité, etc (Collège national des universitaires en psychiatrie, 2016; Thabtah and Peebles, 2019). Pour cette échelle d'évaluation, aucune limite précise n'est déterminée pour diagnostiquer un TSA. En effet, selon la limite sélectionnée, la sensibilité et la spécificité du test varient. Habituellement un score de 29,5 ou inférieur correspond à un enfant neurotypique, un score supérieur à 30 à un TSA léger à modéré et un score supérieur à 37 à une forme sévère. Certaines études proposent qu'un score supérieur à 25 correspondrait à un TSA tandis qu'un score égal ou inférieur correspondrait à un enfant non autiste avec la meilleure sensibilité et spécificité (Chlebowski et al., 2010).

A partir de ces échelles d'évaluation clinique de nouvelles versions se sont développées ou de nombreuses autres échelles sont apparues.

### B. Causes de la pathologie

Les TSA sont des pathologies multifactorielles avec des causes génétiques et des causes environnementales. Les TSA ont une forte tendance à être transmis à la descendance et sont distribués dans la population avec un ratio homme/femme de 4:1 (Anagnostou et al., 2014).

#### 1. Facteurs génétiques

Une centaine de gènes différents ont été décrits comme associés aux TSA soit par leur délétion ou la duplication de leur expression. Tous ces gènes apparaissent liés au développement neuronal (principalement liés à la fonction synaptique), à la migration neuronale et à la condensation de la chromatine (De Rubeis et al., 2014; Krumm et al., 2015). Il existe des mutations rares et des mutations plus courantes dans les TSA. Les mutations rares concernent des mutations *de novo* non héritées des parents. Parmi celles-ci, il existe des mutations d'un seul gène comme par exemple le syndrome de Rett ou encore le syndrome de l'X-Fragile qui sont souvent associés aux TSA.

Ces mutations peuvent aussi être dues à l'augmentation du nombre de copie d'un gène ou la variation d'un seul nucléotide aboutissant à un gène tronqué ou à une protéine non fonctionnelle (Woodbury-Smith and Scherer, 2018). Des mutations génétiques courantes sont ainsi retrouvées chez les personnes atteintes de TSA, comme la mutation de SHANK3, une protéine de transport post-synaptique (Moessner et al., 2007), de CHD8, une protéine impliquée dans la condensation de la chromatine (Cotney et al., 2015), de TPH2, protéine impliquée dans la synthèse de 5-HT (Ramos et al., 2006), ou encore NRXN1 et NLGN, des protéines impliquées dans la synapse (Onay et al., 2016), etc. La mutation d'un grand nombre de gènes semble aboutir à un phénotype de TSA chez les patients, ou dans certains modèles animaux.

#### 2. Facteurs épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont actuellement de plus en plus étudiées dans le cadre des pathologies. Dans les TSA, des facteurs épigénétiques sont proposés par la communauté scientifique tels que la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones, le remodelage de la chromatine, ou encore la mutation de la MCEP2 qui est associée à 4% des cas de TSA (Waye and Cheng, 2018). L'ensemble de ces études nécessite des explorations plus poussées avant de pouvoir l'envisager comme une voie thérapeutique potentielle.

#### 3. Facteurs environnementaux

Il existe de nombreux facteurs environnementaux reconnus comme intervenant dans l'apparition des TSA chez l'individu.

##### a. Age parental

L'âge des parents est un risque établi au sein de la littérature. Il a été montré dans une cohorte de patients localisés sur plusieurs lieux géographiques que l'âge avancé de la mère et du père étaient un facteur de risque important pour l'apparition des TSA chez l'enfant (Sandin et al., 2016). Des études montrent également que moins l'âge est élevé moins le risque d'avoir un enfant atteint de



TSA est élevé (Wu et al., 2017a). Cela peut s'expliquer par l'augmentation du risque de mutation *de novo* dans les gamètes (Jónsson et al., 2017), même si cela est davantage démontré pour un père d'un âge avancé et moins chez la mère (Kong et al., 2012).

### b. Facteurs de risque maternels

De nombreuses modifications de l'environnement du fœtus chez la mère peuvent être responsables de l'apparition de TSA chez l'enfant :

- Déséquilibre hormonal : des études ont démontré qu'un déséquilibre hormonal chez la mère pouvait augmenter les risques de TSA chez l'enfant. Un taux de testostérone trop élevé au niveau du fœtus peut influencer le développement de l'enfant pour les comportements sociaux et l'empathie accentuant les traits autistiques (Auyeung et al., 2013). Appuyant cette théorie, des études montrent qu'un fort taux de testostérone fœtal peut modifier le développement cérébral similairement aux modifications retrouvées dans les TSA (Lombardo et al., 2012). Une étude montre par ailleurs qu'un polymorphisme des gènes concernant la synthèse des stéroïdes sexuels était associé aux TSA (Chakrabarti et al., 2009).
- L'obésité maternelle : elle est un risque accru de développer des TSA chez l'enfant (Getz et al., 2016), mais cela reste encore discuté à l'heure actuelle. Des études montrent que l'association entre l'obésité maternelle et le risque de TSA chez l'enfant n'est pas systématique (Gardner et al., 2015).
- Diabète ou hypertension : des associations plus légères existent entre les TSA et des pathologies telles que le diabète gestationnel (Xiang et al., 2015) ou l'hypertension (Maher et al., 2018). Cependant des études approfondies doivent être menées pour pouvoir conclure à un risque dans l'apparition de la pathologie.
- Infection ou activité immunitaire : une étude sur une cohorte de taille importante en Suède montre que l'infection maternelle augmenterait de 30% de le risque de TSA chez l'enfant (Lee et al., 2015). Le risque ne proviendrait pas de la présence d'un virus ou d'une bactérie mais de la réponse immunitaire maternelle démontrée par de forts marqueurs de l'inflammation systémique (Brown et al., 2014).

### c. Environnement fœtal et du jeune enfant

Ici aussi lors du développement du fœtus ou de l'enfant de nombreux facteurs peuvent intervenir et être en cause dans l'apparition des TSA :

- Médication : la prise de médicament pendant la grossesse ou la lactation, ou chez le jeune enfant peut augmenter les risques de développer des TSA. Deux médicaments chez la femme enceinte ressortent régulièrement comme étant associés à des risques de TSA chez l'enfant. Ces traitements sont le valproate (Gentile, 2014), un traitement antiépileptique ou pour le traitement des troubles bipolaires, et les inhibiteurs sélectifs de la 5-HT (Charlton et al., 2015) utilisés dans le traitement de la dépression chez la femme enceinte. Cependant l'implication de ces médicaments dans l'apparition des TSA reste controversée (Brown et al., 2017).

- Cigarette et alcool : malgré le fait que fumer et boire expose le fœtus à des problèmes développementaux, aucune étude n'indique que la consommation de tabac chez la mère est un risque accru de développer des TSA (Jung et al., 2017). De la même manière, des consommations faibles ou modérées d'alcool chez la femme enceinte ne sont pas un facteur de risque pour les TSA (Gallagher et al., 2018).
- Nutrition : la nutrition maternelle influence fortement le développement du fœtus. Il est connu qu'un intervalle court entre deux grossesses peut appauvrir la mère en nutriments et fortement augmenter les risques de TSA (Conde-Agudelo et al., 2016). Des carences alimentaires comme par exemple une carence en vitamine D (Wang et al., 2016) ou encore une carence en zinc ont été montrées chez des personnes atteintes de TSA (Arora et al., 2017).
- Vaccination : contrairement à la croyance commune liant la vaccination et le développement des TSA, il a été montré qu'aucune corrélation n'existait entre ces deux éléments (Taylor et al., 2014). Cette association a été faite suite à la publication de travaux montrant une association entre vaccination du ROR et TSA, mais après étude par la communauté scientifique il a été mis en évidence que les résultats obtenus étaient falsifiés (Deer, 2011).
- Toxiques environnementaux : les toxiques environnementaux sont nombreux dans la société actuelle. Alors que les études concernant la pollution de l'air ou les métaux lourds ne montrent qu'une faible implication dans l'apparition des TSA (Rossignol et al., 2014), le rôle des pesticides dans les TSA est clairement démontré lors d'exposition de la femme enceinte ou du jeune enfant (Kalkbrenner et al., 2014).

## II. Troubles comportementaux et atteintes centrales dans les troubles du spectre autistique

### A. Troubles comportementaux

Il est très difficile de nommer des signes cliniques précis pour caractériser les TSA. En effet, du fait de la forte hétérogénéité de ce spectre, les signes cliniques dépendent fortement de la localisation du patient au sein du spectre autistique. Il est cependant convenu que trois comportements ressortent majoritairement chez les personnes atteintes de TSA (APA, 2013) :

- Des difficultés dans l'interaction sociale,
- Des problèmes de communication,
- Des comportements répétitifs et restreints.

Les déficits d'interactions sociales apparaissent généralement durant les deux premières années de vie chez l'enfant (Mitchell et al., 2006; Zwaigenbaum et al., 2005). L'enfant dans le très jeune âge aura des difficultés à porter son attention sur des objets qui lui sont montrés ou sur les expressions faciales de l'adulte. Par exemple lorsqu'un parent pointe un objet du doigt en disant « regarde » l'enfant neurotypique porte son attention sur l'objet indiqué, tandis qu'un enfant atteint de TSA ne le fera pas (Zwaigenbaum et al., 2005). Les enfants atteints de TSA sont aussi moins aptes à répondre à un stimulus social comme répondre à leur prénom (Mundy et al., 2010). Les personnes atteintes de TSA ont également des difficultés à comprendre et percevoir l'autre

ou manque de « la théorie de l'esprit ». Cette théorie permet à un individu d'attribuer des états mentaux à soi-même ou à d'autres individus selon la réaction ou le comportement des autres (Andrés-Roqueta and Katsos, 2017; Baron-Cohen et al., 1985).

Les TSA sont aussi caractérisés par des problèmes de communication. Chez le jeune enfant neurotypique cela peut s'observer dans un âge précoce, lorsqu'il mime ou répète ce qu'il entend ou voit immédiatement après. A l'inverse, un enfant atteint de TSA aura un délai pour ce genre de mimique qui peut aller de la simple heure à quelques jours (Prelock and Nelson, 2012). Les enfants atteints de TSA ont d'autres problèmes de communication comme l'absence de regard approprié, d'expression dans le regard, l'absence de la reconnaissance de la voix de la mère, une ignorance des vocalisations avec un grand intérêt pour les sons environnants, un manque ou une absence complète des gestes accompagnant le discours (pointer, montrer), etc. (Johnson et al., 2007).

Le dernier point caractéristique des TSA est un comportement répétitif et restreint. Les enfants atteints de TSA peuvent montrer des réponses atypiques d'un large spectre comme un attachement à un objet, des obsessions, des stéréotypies. Les stéréotypies sont des comportements répétitifs, non fonctionnels comme un claquage de main ou un mouvement de doigt. Ces stéréotypies peuvent empêcher la personne d'accomplir une tâche ou d'en apprendre une nouvelle (Stone et al., 1999). Les personnes atteintes de TSA peuvent également montrer un intérêt fort pour un sujet précis, comme par exemple une obsession pour les trains. Le sujet d'intérêt peut être typique pour tout enfant d'un certain âge, mais c'est le degré d'intérêt qui peut devenir anormal chez un enfant atteint de TSA (Johnson et al., 2007).

Il est à noter que les personnes atteintes de TSA n'expriment pas l'ensemble des signes décrits précédemment avec la même intensité. Le diagnostic de ces signes se fait généralement dans les trois premières années de vie de l'enfant (Lai et al., 2014).

### B. Atteintes du système nerveux central

En plus des différences de comportements chez les personnes atteintes de TSA, il a été démontré des modifications structurales du cerveau et de la connectivité cérébrale.

Des études ont montré des modifications structurales du cerveau chez ces patients avec par exemple une réduction de la substance grise au niveau du cervelet, de l'hippocampe, de l'amygdale et du lobe pariétal accompagnée d'une augmentation du volume de substance grise dans les régions frontales, striatales et temporales (Carlisi et al., 2017). Des études par IRM fonctionnelle démontrent une modification de l'activation de nombreuses structures cérébrales comme le cortex préfrontal, le siège d'un grand nombre de fonctions cognitives (Duerden et al., 2013; Fan et al., 2012). Des études montrent aussi une augmentation du volume total du cerveau chez ces patients, avec une augmentation de la substance grise totale uniquement chez les enfants atteints de TSA (Riddle et al., 2017), sans modification de la substance grise chez l'adulte.

Il est cependant difficile d'identifier avec précision les modifications cérébrales chez les personnes atteintes de TSA du fait de la forte hétérogénéité de la pathologie recouvrant un spectre

de mutations génétiques et de facteurs environnementaux aboutissant à de nombreux phénotypes pathologiques différents.

Les modèles animaux permettent cependant d'étudier en partie les différences de connectivité cérébrale selon les différentes mutations génétiques observées dans les TSA. De ce fait, il a été démontré dans des modèles animaux une perte de la plasticité ou de la maintenance synaptique, ainsi que des difficultés dans les contrôles moteurs (Stoodley et al., 2017; Tatavarty et al., 2018). Il a été mis en évidence des déficits des circuits sensoriels, des modifications des circuits d'apprentissage et des déficits dans les circuits de sociabilité chez ces animaux. Ces modifications reflètent un déséquilibre dans la balance excitation/inhibition des réseaux neuronaux mais également la modification de la morphologie des dendrites et synapses observée dans ces modèles animaux (Golden et al., 2018). Il faut noter qu'une partie de ces déficits dans les différents réseaux neuronaux sont réversibles lorsqu'un traitement cible spécifiquement ce réseau. Par exemple, chez des animaux déficients en SHANK3, il est mis en évidence un toilettage abusif qui peut être corrigé par une modification de la balance excitation/inhibition de ce circuit. Les animaux n'ont plus ce comportement stéréotypé pendant plusieurs jours après une stimulation à haute fréquence de ce circuit (Chang et al., 2016).

L'étude animale aide réellement à mieux comprendre les mécanismes et les modifications des structures centrales dans les TSA, mais du fait de l'hétérogénéité du spectre, il est nécessaire d'étudier de nombreux modèles pour mieux appréhender la pathologie des TSA au niveau central.

### III. Atteintes immunitaires dans les troubles du spectre autistique

L'hypothèse de la pathologie auto-immune concernant les TSA est une voie de recherche importante (Ashwood and Van de Water, 2004). A l'heure actuelle de nombreuses recherches ont émergées pour identifier la part de responsabilité de l'immunité dans cette pathologie. Plusieurs facteurs immunitaires ont été démontrés comme pouvant être importants dans l'apparition de TSA chez les enfants. C'est le cas d'auto-immunité familiale (Molloy et al., 2006), d'immunité de la mère contre les antigènes du fœtus (Piras et al., 2014) ou encore d'activation immunitaire maternelle (Zerbo et al., 2015).

En plus des troubles immunitaires parentaux, chez les patients atteints de TSA des troubles ou dysfonctions immunitaires ont été mis en évidence. Des anticorps dirigés contre les protéines de l'hôte sont retrouvés dans le sérum des patients (Frye et al., 2016; Mostafa and AL-Ayadhi, 2015), un phénomène régulièrement retrouvé dans les pathologies auto-immunes. Il a notamment été démontré une dysrégulation de l'immunité innée et adaptative avec par exemple une sur-activation microgliale (Morgan et al., 2010), une augmentation du taux de cytokines circulantes (Suzuki et al., 2011) et une augmentation de l'activation lymphocytaire (Ashwood et al., 2011).

Pour finir, les patients atteints de TSA ont de forte comorbidité pour des maladies auto-immunes ou liées à l'immunité comme l'allergie, l'asthme ou encore des pathologies digestives (Chen et al., 2013). En effet, il a été démontré qu'une sur-activation immunitaire pouvait influencer l'intégrité de l'épithélium digestif et induire des troubles gastro-intestinaux (Eichele and Kharbanda, 2017).

### IV. Troubles digestifs et atteintes digestives dans les troubles du spectre autistique

#### A. Troubles digestifs

En plus des troubles cognitifs mis en évidence chez les personnes atteintes de TSA, il est important de noter que ces personnes sont atteintes de troubles gastro-intestinaux récurrents. En effet, le taux de troubles gastro-intestinaux varie de 20 à 90% selon les études, avec en moyenne un taux de 70% de personnes atteintes de TSA (Iovene et al., 2017; Lai et al., 2014) qui souffrent de problèmes gastro-intestinaux tels que la constipation, des douleurs abdominales, des diarrhées, des reflux gastro-œsophagiens (Fulceri et al., 2016; Gorrindo et al., 2012; Kang et al., 2014; McElhanon et al., 2014; Shindler et al., 2020). Hormis les études sur des petits groupes de patients, des méta-analyses sur 340 et 412 enfants atteints de TSA confirment cette prédominance des troubles gastro-intestinaux par rapports aux contrôles neurotypiques (Horvath and Perman, 2002), avec pour trouble majeur la constipation (Ferguson et al., 2019). Néanmoins d'autres études ne montrent pas une fréquence plus importante des troubles gastro-intestinaux chez les patients atteints de TSA (Black et al., 2002; Ibrahim et al., 2009; Pusponogoro et al., 2015).

Un lien entre les troubles digestifs et les scores comportementaux est suggéré. En effet, une étude a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre le score de diagnostic et la sévérité des troubles gastro-intestinaux (Adams et al., 2011). Cette corrélation a été retrouvée dans une autre étude qui met en relation le score de l'échelle CARS et le taux de zonuline sanguin, indiquant un lien positif entre le score TSA et la perméabilité intestinale (Esnafoglu et al., 2017). Cependant, ces relations entre les scores TSA et les problèmes gastro-intestinaux restent discutées : une étude montre quant à elle qu'aucune relation n'existe entre le score de l'échelle CARS et les troubles gastro-intestinaux (Iovene et al., 2017).

Ces équipes proposent plusieurs hypothèses pour expliquer que les troubles gastro-intestinaux sont potentiellement plus fréquents chez les TSA : des troubles alimentaires avec sélection de nourriture induisant la constipation (Ibrahim et al., 2009), des troubles gastro-intestinaux dus à une alimentation riche en gluten (Heberling et al., 2013). Cette dernière hypothèse fut réfutée, des étudiants ne montrent aucun lien entre troubles gastro-intestinaux et alimentation riche en gluten chez les enfants atteints de TSA (Józefczuk et al., 2018; Navarro et al., 2015).

Au cours des années, une comorbidité de plus en plus importante avec les troubles gastro-intestinaux est mise en évidence chez les personnes atteintes de TSA, indiquant qu'environ 70% des patients souffrent de troubles digestifs (Lai et al., 2014). Ces troubles ont différentes origines comme une atteinte de la perméabilité, de la motricité ou du SNE.

#### B. Atteintes digestives

##### 1. *Modification de la motricité digestive*

De nombreuses études démontrent des troubles constipatoires ou diarrhéiques chez les patients atteints de TSA, ces troubles étant très souvent associés à des problèmes de motricité digestive. Cependant, peu d'études démontrent un trouble direct de la motricité digestive ou une mesure de la motricité chez ces patients. La constipation est de ce fait généralement associée à un ralentissement de transit, tandis qu'une diarrhée est associée à une accélération (Gabriele et al.,

2016). Les patients peuvent également parfois se plaindre d'une lenteur de leur motricité digestive, comme par exemple ceux mutés pour la protéine CHD8, un protéine impliquée dans la condensation de la chromatine (Bernier et al., 2014).

Dans les modèles animaux, la motricité digestive est davantage étudiée de façon directe. Généralement un colorant est administré aux animaux et permet de mesurer le temps pour l'avancée du bolus alimentaire. Dans un modèle animal d'exposition de la mère gestante au valproate, il a été montré chez la descendance un ralentissement du transit intestinal sans modification de la longueur du tube digestif (Kim et al., 2013). Il est suggéré que cette modification du temps de transit est due à une diminution du taux de 5-HT, un neurotransmetteur connu pour être indispensable dans la motricité digestive (de Theije et al., 2014).

Dans un modèle murin déficient en TCF4 fonctionnel, une mutation reconnue pour le syndrome de Pitt Hopkins appartenant au spectre des TSA, il a été démontré des modifications de la motricité digestive. Sans avoir de malformation anatomique, les animaux présentent un ralentissement du transit intestinal, sans pour autant modifier le nombre de crottes émises ou la longueur intestinale par rapport aux souris sauvages (Grubišić et al., 2015). Cette même équipe propose que les troubles gastro-intestinaux observés dans les TSA pourraient en partie provenir d'une mutation de la connexine 43, une protéine formant les jonctions communicantes (Grubišić and Parpura, 2015). Ce ralentissement du transit est retrouvé dans le modèle animal BTBR, qui montre en plus de ce ralentissement du transit intestinal, une diminution de l'hydratation des selles et une augmentation de la taille du colon. Au sein de ce modèle, il est observé une diminution de la quantité de sels biliaires secondaires connus pour activer la motricité digestive (Golubeva et al., 2017). Cependant, les auteurs proposent que les effets sur la motricité pourraient provenir d'une diminution de la biodisponibilité de 5-HT, ce modèle étant couplé à une diminution de l'activité d'enzyme de synthèse et une augmentation de la recapture par le transporteur de la 5-HT nommé SERT.

Similairement, il existe un modèle animal avec une sur-activation seule du transporteur SERT rendant la 5-HT moins disponible au niveau du tissu. Dans ce modèle animal, il a été montré un ralentissement du temps de transit intestinal qui peut être rétabli à la normale suite à l'injection de 5-HT au niveau digestif (Margolis et al., 2016). Cette équipe a retrouvé une diminution du nombre de complexes moteurs migratoires chez ces animaux. Ce phénomène de diminution des complexes moteurs semble passer par la voie de la MAP Kinase, puisque lors d'utilisation d'inhibiteurs de cette voie, les complexes moteurs sont rétablis à la normale. Cependant cette voie n'est pas en jeu pour l'intégralité des problèmes de motricité observés dans ce modèle animal (Robson et al., 2018). Un autre modèle de TSA, le modèle  $FOXP1^{-/-}$  montrent un ralentissement du transit intestinal accompagné d'une atrophie de la tunique musculaire au niveau du colon (Fröhlich et al., 2019).

Dans d'autres modèles murins comme le modèle déficient en Neurologine3 fonctionnelle, il a été montré une modification du diamètre du colon, sans affectation du nombre de complexes moteurs. Ces souris ayant une accélération de la fréquence des complexes moteurs, les auteurs proposent que la délétion de la Neurologine3 induit une augmentation du diamètre du colon par le biais d'une

diminution du tonus musculaire lisse basal dans le tube digestif (Leembruggen et al., 2019). De plus, le transit est accéléré pour les souris mutées *Neurologin3* au niveau de l'intestin grêle, phénomène compensé par une diminution de la motricité du colon (Hosie et al., 2019).

Les modifications de motricité digestive ne sont pas uniquement observées dans les modèles murins. Ceci peut être également observé dans des modèles de poisson zèbre : dans le modèle de mutation *CHD8* rendant la protéine non fonctionnelle, il a été montré une diminution de la motricité digestive (Bernier et al., 2014). De plus, dans le modèle de mutation *SHANK3*, il est observé une diminution du nombre de contractions péristaltiques et une augmentation du temps de transit (James et al., 2019). Dans ce dernier modèle les troubles de motricité peuvent être reversés par l'expression de la protéine humaine *SHANK3* par des siRNA.

### *2. Modification de la perméabilité intestinale*

La modification de la perméabilité intestinale au sein des TSA est discutée au sein de la littérature. Des études montrent une augmentation du ratio de lactulose/mannitole chez les adultes ou enfants atteints de TSA, traduisant une augmentation de la perméabilité intestinale chez ces individus. Pour rappel, le lactulose est un sucre de petite taille permettant de quantifier la perméabilité paracellulaire, tandis que le mannitol est un sucre de taille plus importante utilisant plutôt la voie transcellulaire. Cette augmentation du ratio L/M est retrouvée dans plusieurs études allant d'un petit groupe de patients à une plus grosse cohorte (D'Eufemia et al., 1996; Horvath and Perman, 2002). D'autres études montrent une augmentation de la perméabilité chez les TSA par une augmentation du taux de zonuline sanguine (Esnafoglu et al., 2017). A l'opposé des études démontrent que les patients atteints de TSA n'ont pas de modification de la perméabilité intestinale (Kushak et al., 2016; Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015; Robertson et al., 2008). Cependant ces résultats peuvent s'expliquer par un très faible nombre de patients avec par exemple seulement quatorze patients atteints de TSA et huit neurotypiques (Robertson et al., 2008). Les différences entre ces études peuvent également s'expliquer par une catégorisation des patients atteints de TSA. En effet, des études montrent que seule une partie des patients atteints de TSA dans leurs études ont une augmentation de la perméabilité intestinale (Gabriele et al., 2016; de Magistris et al., 2010).

Plusieurs explications sont proposées pour expliquer l'augmentation de la perméabilité intestinale chez ces patients. Certains auteurs proposent qu'elle serait due à une augmentation de la composante inflammatoire connue pour modifier les paramètres de la BEI (Heberling et al., 2013; Rose et al., 2018a). D'autres études démontrent que cela pourrait provenir d'une modification de l'expression des protéines de jonctions serrées avec une diminution de l'expression protéique de la claudine, de l'occludine, de la tricelluline, et une augmentation des marqueurs de pore type claudine-2 chez les patients (Fiorentino et al., 2016; Iovene et al., 2017).

Ces deux hypothèses sont retrouvées au niveau des modèles animaux de TSA, avec une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une diminution des marqueurs de jonctions serrées (Coretti et al., 2017; Cristiano et al., 2018; Golubeva et al., 2017; Hsiao et al., 2013; Sauer et al., 2019). L'association avec l'augmentation de l'inflammation digestive est également proposée dans les modèles animaux, phénomène démontré par une infiltration des cellules

immunitaires au niveau de la BEI (Coretti et al., 2017; Cristiano et al., 2018; de Theije et al., 2014) ainsi qu'une plus grande sensibilité à la colite (Wei et al., 2017).

En plus des problèmes de perméabilité digestive, les modèles animaux de TSA montrent un remodelage de la structure intestinale avec des modifications de la longueur des vili (Sauer et al., 2019), de la prolifération et de la croissance des CEI (Margolis et al., 2016) ou encore de l'épaisseur de la muqueuse (Kim et al., 2013) qui diffèrent selon le modèle animal utilisé.

### 3. *Modification du système nerveux entérique*

A l'heure actuelle aucune donnée n'existe concernant les potentielles modifications du SNE dans le tube digestif de personnes atteintes de TSA. Cependant de nombreux modèles animaux de TSA, induits par des mutations génétiques ou facteurs environnementaux, montrent un remodelage du SNE.

Parmi les modèles environnementaux, il existe le modèle d'exposition de la mère gestante au valproate, un traitement antiépileptique utilisé pour les femmes enceintes. Il est observé dans la descendance une modification de la quantité de 5-HT au niveau de l'iléon uniquement chez les mâles, cumulée à une diminution du nombre de cellules 5-HT positives. Cependant, il n'est pas établi si cette diminution est due à une modification directe de la production neuronale de 5-HT ou si cela affecte majoritairement les cellules entérochromaffines, productrices majoritaires de la 5-HT intestinale. Les auteurs émettent l'hypothèse que la voie neuronale est affectée car la 5-HT neuronale est connue pour promouvoir la croissance et le renouvellement de la muqueuse épithéliale, phénomène absent dans ce modèle animal (de Theije et al., 2014).

Dans des modèles génétiques, une altération du SNE a été mise en évidence. Dans le modèle de mutation de CHD8 chez le poisson zèbre, il a été démontré une diminution d'environ 50% du nombre de neurones entériques au sein du tube digestif. Les auteurs proposent deux théories : une diminution de la prolifération des progéniteurs neuraux accompagnée d'un défaut de colonisation des NCC (Bernier et al., 2014). Dans le modèle de mutation du transporteur SERT, aboutissant à une augmentation de la recapture de la 5-HT et donc à une diminution de la 5-HT circulante, il a été montré une diminution du nombre de neurones entériques dans le plexus myentérique et sous-muqueux des souris. Cette hypoplasie du SNE est due à l'absence de 5-HT, connue pour promouvoir le développement neuronal. L'hyperactivité de la recapture de la 5-HT *via* SERT diminue ainsi le développement du réseau nerveux. Les auteurs proposent que le nombre de neurones entériques est inversement proportionnel à l'activité de la SERT au cours du développement (Margolis et al., 2016). Un autre modèle très utilisé dans l'étude des TSA est le modèle BTBR, donnant lieu à un phénotype TSA-like pour le comportement. Il a été montré au sein de ce modèle une diminution du développement du SNE. Cela a été mis en évidence par une diminution de la densité spatiale du plexus myentérique, une diminution de 50% des motoneurones inhibiteurs nNOS<sup>+</sup> et du nombre total de cellules HuC/D positives. Les auteurs proposent l'hypothèse d'un développement anormal des neurones excitateurs et inhibiteurs aboutissant à un déséquilibre de la balance excitation/inhibition nécessaire à un fonctionnement digestif physiologique (Golubeva et al., 2017).



Dans un autre modèle murin, avec une mutation délétère pour la Neuroligin3, il a été démontré que le SNE était affecté différemment des autres modèles. En effet, le nombre de neurones au niveau du colon entre le génotype muté et sauvage ne diffère pas, tout comme le nombre de neurones NOS<sup>+</sup> et Ach<sup>+</sup>. Cependant la délétion du gène affecte le phénotype du SNE. Les auteurs observent une modification de la motricité digestive avec une augmentation de la rapidité des complexes migratoires moteurs, supposant une modulation des voies inhibitrices de la motricité par la Neuroligin3 (Leembruggen et al., 2019). Néanmoins, une autre étude de ce modèle suggèrent une modification du SNE au niveau du jéjunum avec une diminution de 30% du nombre de neurones par ganglion et plus particulièrement une diminution de la proportion de neurones NOS<sup>+</sup> indiquant une altération du SNE (Hosie et al., 2019).

#### 4. Modification du microbiote intestinal dans les troubles du spectre autistique

De nombreuses études se sont intéressées ces dix dernières années au microbiote intestinal dans les TSA et à son implication dans l'apparition ou le maintien de la pathologie (Hughes et al., 2018). Il a été montré une dysbiose intestinale chez ces patients comparativement à des sujets neurotypiques. Cette dysbiose, en plus d'être potentiellement responsable des troubles immunitaires et gastro-intestinaux observés, peut altérer le comportement des personnes atteintes de TSA (Kang et al., 2017; Sandler et al., 2000). L'étude la plus ancienne proposait que l'utilisation excessive d'antibiotiques aboutit à une croissance anormale de *Clostridium* qui produit un excès de métabolites toxiques pour l'enfant et donne chez certains un TSA. En traitant les enfants à la vancomycine, pour diminuer le taux de métabolites bactériens toxiques, puis en administrant des probiotiques à des enfants les auteurs observaient une augmentation du score comportemental. Cependant l'effet n'était pas conservé à long terme, sûrement à cause de la résilience du microbiote intestinal (Sandler et al., 2000). Dans la continuité de ces travaux, une équipe a montré par technique de PCR une augmentation de la quantité de *Clostridium* jusqu'à neuf fois plus importante chez les patients atteints de TSA, augmentation corrélée avec l'apparition de troubles gastro-intestinaux (Parracho, 2005). Suspectant un déséquilibre de la flore intestinale chez les patients atteints de TSA, des études se sont intéressées au séquençage des populations bactériennes composant le microbiote intestinal chez ces patients. Il a donc par la suite été montré une différence dans les proportions relatives des phyla avec une augmentation des *Bacteroidetes* et une diminution des *Firmicutes* modifiant ainsi le ratio *Bacteroidetes/Firmicutes* de l'homéostasie digestive (Finegold et al., 2010; Lee et al., 2017b).

Par la suite, d'autres études suivirent et il n'apparaît à l'heure actuelle pas de consensus clairement défini sur le microbiote intestinal dans les TSA. Une méta-analyse de 15 études sur le microbiote intestinal montre que les études se contredisent sur la composition bactérienne (Cao et al., 2013). En effet, des études montrent une augmentation de la diversité bactérienne chez les patients atteints de TSA (De Angelis et al., 2013; Finegold et al., 2010) tandis que d'autres trouvent une tendance inverse (Kang et al., 2013b, 2018) ou bien pas de modification de la diversité bactérienne entre les deux groupes (Kushak et al., 2017; Lee et al., 2017b). Les études se concentrent davantage sur le ratio *Bacteroidetes/Firmicutes* mais là encore les études démontrent soit une augmentation soit une diminution de ce ratio (De Angelis et al., 2013; Finegold et al., 2010; Strati et al., 2017). Ces différences peuvent en partie s'expliquer par des techniques différentes de

collecte du microbiote intestinal d'une étude à l'autre, des sous catégories de patients atteints de TSA sélectionnées ou des contrôles utilisés qui sont parfois apparentés aux patients TSA. Il faut également noter que le microbiote intestinal varie fortement par l'action de facteurs externes comme le stress ou l'alimentation (Rodríguez et al., 2015). Il est reconnu que les patients atteints de TSA ont des troubles alimentaires avec des préférences ou aversions de nourriture aboutissant à une palette alimentaire extrêmement réduite (Marí-Bauset et al., 2014). Ceci peut expliquer les différents résultats retrouvés dans les études de séquençage du microbiote. Cependant le microbiote intestinal joue un rôle potentiellement important dans les TSA, à la fois au niveau des troubles gastro-intestinaux et des troubles comportementaux observés. Une étude prospective a démontré que la transplantation fécale bactérienne chez des enfants atteints de TSA, souffrant de troubles gastro-intestinaux et comportementaux, peut améliorer leurs scores cliniques comportementaux et leurs troubles intestinaux (Kang et al., 2017). Ces modifications phénotypiques sont conservées jusqu'à deux ans après la transplantation fécale pour la grande majorité des patients, phénomène permis par la modification de la structure du microbiote associée à une augmentation de la diversité (Kang et al., 2019).

La dysbiose intestinale se retrouve dans les différents modèles animaux de TSA (Golubeva et al., 2017; Hsiao et al., 2013; Sauer et al., 2019) avec une modification des populations bactériennes, de la diversité et du ratio *Bacteroidetes/Firmicutes*. L'ensemble de ces modifications laissent penser que l'utilisation de ces modèles est possible pour une meilleure compréhension du rôle du microbiote intestinal dans la pathologie. Les bactéries intestinales sont capables de modifier la réponse de l'hôte par la synthèse et la libération de métabolites au niveau du lumen intestinal (Doenyas, 2018).

### a. Modifications des médiateurs du microbiote intestinal

#### Les acides gras à chaîne courte

De nombreuses études s'intéressent aux AGCC dans les TSA. Il a été montré des modifications des concentrations en AGCC dans les selles de patients atteints de TSA. Des études démontrent une augmentation de la quantité d'acétate et de propionate avec une diminution du butyrate chez les patients atteints de TSA (De Angelis et al., 2013). Cela étant couplé à une diminution de la quantité totale d'AGCC dans les selles de patients atteints de TSA (Adams et al., 2011). Ici encore il est possible de retrouver des différences dans les dosages d'AGCC, avec une étude montrant une augmentation de l'acétate, du propionate et du butyrate couplé à une augmentation du total d'AGCC (Wang et al., 2012a) ou encore aucune différence entre un groupe TSA et un groupe contrôle (Kang et al., 2018). Malgré les différences observables dues à la collecte des échantillons et à la constitution des groupes, il est émis l'hypothèse que ces trois AGCC sont impliqués dans la pathologie des TSA (MacFabe, 2015). Ces AGCC sont aussi modifiés dans les modèles animaux de TSA comme dans le modèle BTBR avec une diminution de l'acétate et une augmentation du butyrate (Golubeva et al., 2017).

Le butyrate est, comme décrit précédemment, connu pour moduler les fonctions digestives (Li et al., 2018) et des dysrégulations du butyrate dans les TSA pourraient en partie produire des troubles gastro-intestinaux. Une étude suggère même l'implication du butyrate dans les dysfonctions

mitochondriales observées dans les TSA (Rose et al., 2018b), laissant suggérer que cet AGCC n'est pas le seul responsable des troubles digestifs observés dans les TSA.

Le propionate quant à lui possède une toute autre implication dans les TSA. En plus des modifications de concentration relevées chez les patients atteints de TSA, l'instillation du propionate en intracérébral à des animaux a été démontré comme induisant un phénotype similaire aux TSA avec des déficits en interaction sociale, additionnés d'une forte neurotoxicité de ce métabolite bactérien (MacFabe et al., 2011; Shultz et al., 2008). Par la suite, il a été montré que quel que soit le mode d'injection du propionate à des animaux (sous-cutané, gavage intragastrique, intrapéritonéal) un phénotype similaire aux TSA apparaissait chez ces animaux (Choi et al., 2018). Le propionate est connu pour avoir la capacité de moduler la biodisponibilité en dopamine et en 5-HT au niveau du colon distal (Mitsui et al., 2005b), suggérant un potentiel rôle dans un déséquilibre neurochimique au niveau central. L'hypothèse de son rôle dans l'apparition des TSA suite à une dysbiose intestinale est étudiée de façon prononcée (MacFabe, 2015).

### Les sels biliaires

A l'heure actuelle, aucune étude n'a mesuré les taux de sels biliaires secondaires chez les personnes atteintes de TSA. Cependant, dans le modèle animal BTBR, reconnu comme un excellent modèle pour l'étude des TSA, il a été mis en évidence une différence de concentration entre les sels biliaires conjugués et non conjugués par rapport à des souris sauvages. Les sels biliaires conjugués sont d'ordre général tous augmentés dans les selles des souris tandis que la concentration en LCA non conjugué est diminuée par rapport à des souris sauvages. Il est notamment démontré que ces souris ont un ratio sels biliaires primaires/secondaires modifié par rapport aux souris sauvages, indiquant que ces animaux ont des capacités réduites dans la métabolisation des sels biliaires primaires (Golubeva et al., 2017).

## Objectifs de thèse

---

La période périnatale est une période-clef dans le développement et la maturation des organismes. Cette période est aussi de plus en plus reconnue comme cruciale dans la programmation de la santé et des pathologies de l'adulte. Ce constat est basé sur le fait que cette période de plasticité des organes peut être modulée, en particulier par des facteurs environnementaux parmi lesquels figure le microbiote.

Ce concept s'applique également au tube digestif qui joue un rôle central dans la survie des organismes tout en étant un organe qui peut se révéler être un acteur-clef dans le développement des maladies chroniques et centrales. De nombreuses études ont en effet mis en évidence des dysfonctions digestives dans les pathologies centrales qu'elles soient neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou neurodéveloppementales comme les TSA. Ces dysfonctions peuvent impacter la qualité de vie des patients car elles sont peu prises en charge. De plus, elles pourraient traduire une implication directe du tube digestif dans les processus d'apparition de ces pathologies.

Les troubles digestifs sont souvent associés à une modification du SNE qui possède un rôle majeur dans le contrôle des grandes fonctions digestives. Effectivement, le SNE est capable de réguler la fonction de barrière intestinale mais également de moduler la motricité digestive. Nonobstant, le SNE n'est pas le seul régulateur des grandes fonctions digestives : de nos jours le microbiote intestinal est mis en cause dans les troubles digestifs, principalement par son action sur le SNE. Le microbiote se met en place pendant la jeune enfance et contribue au cours de la vie de l'hôte au développement, à la maturation et à la régulation des fonctions du SNE. Ce dernier colonise précocement le tube digestif et poursuit sa maturation au cours de la période périnatale sous l'influence de nombreux facteurs. Toutefois, les mécanismes de mise en place et de maturation du SNE restent à ce jour peu connus, en particulier durant la période périnatale. Les interactions entre le microbiote et le SNE, ainsi que leurs conséquences fonctionnelles sur le tube digestif restent à être définies, notamment au cours de pathologie de l'axe intestin cerveau comme les TSA.

De ce fait les objectifs de ce travail de thèse étaient organisés en deux axes principaux :

- Caractériser l'implication de la molécule Sémaphorine 3A dans la mise en place et la maturation du réseau nerveux au niveau du SNE.
- Caractériser les atteintes fonctionnelles et le remodelage digestif dans les TSA induits par le microbiote intestinal.

Ce travail de thèse est constitué de deux articles originaux. Le premier est en révision dans Scientific Reports et le second est en préparation.

Dans le premier article, nous avons montré que la sémaphorine 3A ainsi que son récepteur NRP1 étaient présents au niveau du tube digestif avec une expression modifiée au cours du développement. Cet article démontre le rôle de la sémaphorine 3A dans le guidage axonal et de ce fait son implication dans les phénomènes de maturation du réseau nerveux digestif.

Dans le deuxième article, nous avons montré que le transfert de surnageants fécaux par lavement rectal induisait une modification de la fonction de barrière dans un modèle animal GF-like. Cette modification de fonction est accompagnée d'une modification d'expression des molécules de jonctions de la BEI ainsi qu'un remodelage du SNE se traduisant par une modification d'expression des molécules neuronales et gliales. Par ailleurs, nous avons dosé certains métabolites présents au sein des surnageants fécaux et mis en évidence chez nos patients atteints de TSA une différence de la concentration en sels biliaires secondaires, des métabolites connus pour leurs effets sur les fonctions digestives.

# Résultats

---

## **Article 1 :**

### **Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity: implication in Hirschsprung disease**

## Semaphorin 3A controls enteric neuron connectivity: implication in Hirschsprung disease

Jacques Gonzales, Catherine Le Berre-Scoul, Anne Dariel<sup>#</sup>, Paul Bréhéret, Michel Neunlist and Hélène Boudin\*

Université de Nantes, Inserm, TENS, The Enteric Nervous System in Gut and Brain Diseases, IMAD, Nantes, France

<sup>#</sup>Present address:

Pediatric surgery department, Hôpital Timone-Enfants, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, France

\*Corresponding author:

Inserm UMR1235 - TENS

University of Nantes

1, rue Gaston Veil 44035 Nantes,  
France helene.boudin@univ-  
nantes.fr

### Abstract

Most of the gut functions are controlled by the enteric nervous system (ENS), a complex network of enteric neurons located throughout the wall of the gastrointestinal tract. The formation of ENS connectivity during the postnatal period critically underlies the establishment of gastrointestinal motility, but the factors involved in this maturation process remain poorly characterized. Here, we examined the role of Semaphorin 3A (Sema3A) on ENS maturation and its potential implication in Hirschsprung disease (HSCR), a developmental disorder of the ENS with impaired colonic motility. We found that Sema3A and its receptor Neuropilin 1 (NRP1) are expressed in the rat gut during the postnatal period. At the cellular level, NRP1 was expressed by enteric neurons, where it was particularly enriched at growth areas of developing axons. Treatment of primary ENS cultures and gut explants with Sema3A restricts axon elongation and synapse formation. Surgically resected ganglionic bowel segment from HSCR patients, compared to patients with anorectal malformation, showed reduced expression of the synaptic molecule synapsin 1, which was inversely correlated with Sema3A expression levels. Our study identifies Sema3A as a critical regulator of ENS connectivity and provides a link between altered ENS connectivity and HSCR.

## Introduction

In the nervous system, the formation of neuronal circuits is controlled by a large repertoire of molecules acting in a coordinated manner on axonal elongation and synapse formation. The enteric nervous system (ENS) is part of the peripheral nervous system contained within the gut wall that integrates local and systemic signals to control gut motility, secretion, intestinal permeability and epithelial cell proliferation<sup>1</sup>. The ENS is composed of enteric neurons and glial cells assembled in ganglia interconnected through extensive longitudinal and circumferential axonal arborization. Enteric neurons and glia are derived from precursors that originate in the neural crest, migrate to the gut, and undergo a complex process of developmental maturation spanning to the postnatal period resulting in functional maturation<sup>2,3</sup>. Much progress has been made towards the understanding of the mechanisms that control migration of ENS progenitor cells along the gastrointestinal tract and their differentiation into neurons and glia<sup>2,4-7</sup>. However, our understanding of how enteric neurons begin to extend their neurites to establish connections and innervate the various cell types of the gastrointestinal tract is only beginning<sup>8,9</sup>. The maturation of ENS circuitry during the postnatal period results in major morphological changes of enteric neurons characterized by axon elongation and guidance as well as synapse formation, which are associated with changes in electrophysiological properties<sup>10-13</sup>. Remarkably, these changes are correlated with maturation of gut motility, supporting the critical role of ENS postnatal development in digestive functions<sup>10,14</sup>. It is therefore critical to delineate the mechanisms involved in the formation of the axonal processes that ultimately dictate neuronal connectivity and ENS functions. Evidence indicated that cell migration and axonal outgrowth share common molecular mechanisms in the developing ENS, such as those involving GDNF or sonic hedgehog<sup>15-17</sup>. In particular, the temporal regulation of GDNF expression, together with the diversity of the cellular sources throughout ENS development are thought to underlie the multiple functions attributed to GDNF on neural crest cell migration, neuronal differentiation, neurite extension and synaptogenesis<sup>7,11,18,19</sup>. Semaphorin 3A (Sema3A), a prototypical class 3 secreted semaphorin, could also represent a molecule with multifaceted roles important throughout ENS development because a such diversity of Sema3A activities have been extensively demonstrated in the central nervous system<sup>20</sup>.

Sema3A controls the migration of cortical neurons<sup>21</sup> and is implicated in axon repulsion, dendritic branching and synapse formation of central neurons via binding with its receptor Neuropilin 1 (NRP1)<sup>20,22</sup>. In the ENS, Sema3a has been shown to regulate the entry of sacral enteric neural precursors into the distal hindgut in mice by acting as a repulsive signal secreted from the intestine mesenchyme<sup>23</sup>. Whether Sema3A could also regulate axonal patterning and maturation of the ENS at postnatal developmental stages is currently unknown. Moreover, the expression and distribution of Sema3A and its obligatory receptor NRP1 have never been studied in the ENS. Interestingly, changes in Sema3A expression have been described in the colon of some patients with Hirschsprung disease (HSCR) and rare coding deleterious variants of Sema3A have been identified in HSCR cohorts<sup>24-26</sup>. HSCR is a multifactorial genetic developmental disorder in which the ENS is missing from distal bowel resulting in a tonic contraction of the segment leading to functional obstruction. The only current treatment is the operative removal of the segment devoid of ENS. However, recent studies suggested that the remaining bowel, although considered



healthy, presents also ENS defects such as altered proportion of nitrergic neurons<sup>27</sup>, and that these defects could contribute to intestinal dysmotility that persisted even after the surgery in many HSCR patients. In the current study, we determined the expression and distribution of *Sema3A* and its receptor *NRP1* in the rat developing gut and studied the role of *Sema3A* on neuronal connectivity. Our data showed that *Sema3A* restricts axon extension and synapse formation of enteric neurons. Surgically resected ganglionated bowel segment from HSCR patients showed a decreased synapsin 1 expression as compared to patients with anorectal malformation. Interestingly, synapsin 1 expression in HSCR was inversely correlated with *Sema3A* expression level. Our study identifies *Sema3A* as a critical regulator of ENS connectivity and provides a link between altered ENS connectivity and HSCR.

## Results

### Expression and distribution of *Sema3A* and *NRP1* in rat distal colon

To examine whether *Sema3A* and its obligatory receptor *NRP1* were expressed in the developing rat gut, mRNA and protein expression were assessed in rat distal colon on days 1, 7, 21 and 50 by qPCR and Western blot respectively. Expression of *Sema3A* and *NRP1* mRNA was detected at all ages and showed higher expression levels during the early postnatal period, with a peak at day 7 for both *Sema3A* and *NRP1* (Fig. 1A,B). Western blot for *Sema3A* yielded two main bands of 110 and 160 kDa in gut and brain samples, which is consistent with the reported molecular weight ranging from 95 to 160 kDa<sup>28</sup>. Although a trend towards an increased expression of *Sema3A* was observed from day 1 to day 21, the values did not reach statistical difference between groups (Fig. 1C). In parallel, *NRP1* proteins showed a trend to a gradual decreased expression from day 1 to adults but no statistical difference was observed between groups (Fig. 1D).

To characterize the tissue distribution of *Sema3A* and *NRP1* proteins more specifically within the ENS, whole mount preparations of 7-day-old rat myenteric plexus from distal colon were immunostained for *Sema3A* or *NRP1* and with markers of muscle cells ( $\alpha$ SMA), neurons (Hu, and TuJ1) and glial cells (S100 $\beta$ ). Within the muscle layer, *Sema3A* immunoreactivity exhibited a punctate staining but also, in a few instances, a more homogeneous profile in muscle cells (Fig. 2A,B,C). *Sema3A* immunoreactivity was also found at the interface between the muscle layer and the myenteric plexus. In addition, *Sema3A* immunoreactivity was also observed within the myenteric plexus itself in which *Sema3A* puncta were predominantly found with ganglia throughout the axonal network (Fig. 2A-F). Confocal microscopy serial optical sections of the tissue along the z-axis revealed that the *Sema3A* puncta were the brightest and the most numerous at the interface between the muscle layer and the myenteric plexus and within myenteric ganglia. *NRP1* immunoreactivity was detected in muscle cells, endothelial cells and neurons. In the myenteric plexus, *NRP1* was mostly associated with neurons, particularly with axonal fibers (Fig. 2G,H,I). The same distribution for *Sema3A* and *NRP1* was found in the distal colon of 7- and 36-day-old rats. Within the myenteric plexus, we observed a close proximity of *Sema3A* and *NRP1* labeling, both restricted to the ganglia, suggesting that *Sema3A* proteins are localized in a position to interact with neuronal *NRP1* in the myenteric plexus (Fig.2J,K,L,M).

### **NRP1 is enriched at growth areas of developing axons**

To better characterize NRP1 distribution and localization in developing neurons, we performed primary culture of rat ENS processed for NRP1 and TuJ1 immunostaining at different developmental stages. At 1 day of culture, a stage corresponding to the emergence of the axons, NRP1 was observed at the periphery of the neuronal cell body as well as on axons, with a particularly high concentration at the tips and buds of developing axons and emerging branching points (Fig. 3A). At 7 days of culture, corresponding to a stage of gradual increase of axonal complexity, NRP1 was detected in neuronal cell body and was widely associated with the profuse axonal network (Fig. 3B). As seen at 1 day of culture, thin extending secondary axonal fibers expressed NRP1 proteins with a striking accumulation at the tip of the processes (Fig. 3C). These results suggest that NRP1 receptors localize at specific neuronal subdomains important for axonal development and patterning.

### **Sema3A inhibits axonal outgrowth of enteric neurons**

Based on our finding that NRP1 receptors localized at appropriate positions to regulate axonal outgrowth, we examined whether Sema3A could affect axon development of enteric neurons. Dissociated gut cells prepared from E15 rat embryos previously resuspended in matrigel were cocultured with Sema3A-transfected COS cells placed in matrigel (Fig. 4A). For control condition, we used COS cells transfected with a vector encoding eGFP. The number of axons from enteric neurons that extended outside the matrigel dot was counted in the area facing the COS cells. We found that Sema3A induced a dramatic decrease of the number of axons detected outside of the matrigel dot (Fig. 4 B,C). The effects of Sema3A on axonal outgrowth were also studied on gut explants, a model that preserves the integrity of the tissue (Fig. 4D). Gut explants cultured with eGFP-transfected COS cells showed an extensive colonization of enteric neurons with profuse axonal extensions all around the explants (Fig. 4E). When gut explants were cocultured with Sema3A-expressing COS cells, the layer of enteric neurons was similarly established, but the extent of the axonal arbor was greatly reduced (Fig. 4E). The thickness of the layer containing the neuron cell bodies indicated similar values for explants cultured in the presence of eGFP- or Sema3A-transfected COS cells (Fig. 4F). By contrast, the thickness of the axonal layer was decreased in the presence of Sema3A-transfected COS cells as compared to eGFP-transfected cells ( $159.3 \pm 25.8 \mu\text{m}$  vs.  $374.7 \pm 25.9 \mu\text{m}$  respectively;  $n=7$ ;  $p=0.001$  Mann-Whitney test; Fig. 4G). To further study the effects of Sema3A on neuronal maturation, the number and size of synapses within the axonal network were analyzed in gut explants immunolabeled for synapsin 1, a presynaptic protein associated with synaptic vesicles in axon terminals that plays a key role in neuronal connectivity (Fig. 5A). Gut explants grown with Sema3A-expressing COS cells showed no change in the number of synapses but a decrease in the area of synaptic clusters compared to explants grown with eGFP-expressing COS cells (Fig.

5 B,C;  $0.87 \pm 0.09$  vs.  $1.19 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$  respectively;  $p=0.032$  Mann-Whitney Test). Altogether, these results suggest that *Sema3A* restrains axon extension and synaptic connectivity of enteric neurons.

### **HSCR is associated with reduced expression of the synaptic protein synapsin 1**

To begin to address the pathophysiological implications of *Sema3A/NRP1* expression in ENS developmental disorders, we assessed in surgical human colon tissues the protein expression of *sema3A* and its receptor *NRP1* in HSCR patients compared to a group of patients without HSCR but with ARM. Although Western blot analyses indicated an average value for *Sema3A* in the ganglionic segment of HSCR three times higher than for ARM patients, no significant difference was observed either for *Sema3A* or *NRP1* in HSCR compared to ARM patients (Fig. 6A). To explore whether the ENS neuronal network might be altered in HSCR patients, the protein expression of the neuronal markers *TuJ1* and *PGP9.5*

and of the synaptic marker *synapsin 1* were studied by Western blot. No difference was observed between the two groups for *TuJ1* and *PGP9.5* while a decreased expression of *synapsin 1* was found in HSCR compared to ARM patients (Fig. 6B,C,D). Interestingly, a negative correlation was observed between the expression of *Sema3A* and *synapsin 1* in HSCR patients (Fig. 6E).

## Discussion

Uncovering the mechanisms involved in the formation of enteric neuronal circuitry is critical to better understand the pathophysiology of gut dysfunctions, in particular those involved in motility disorders. In this study, we provide evidence that Sema3A and its receptor NRP1 are expressed in the developing gut and that Sema3A exerts a negative control on axonal elongation and synaptic connectivity during ENS postnatal development. In addition, ganglionated bowel segment from HSCR patients showed a reduced expression of the synaptic molecule synapsin1, which was inversely correlated with Sema3A expression levels. Besides identifying a novel role of Sema3A in regulating enteric neuronal connectivity, our study also suggests that Sema3A might be linked to alterations of ENS connectivity in HSCR, which could contribute to gut dysfunctions in these patients.

Our study demonstrated that Sema3A and its receptor NRP1 are expressed in the rat gut at early postnatal stages. At the cellular level, Sema3A harbored a punctate pattern located in between the muscle cells layer and the myenteric plexus as well as within myenteric ganglia. The punctate pattern for Sema3A observed in the gut is similar to the one described in previous studies carried out on brain slices or in cultures of central neurons<sup>29-31</sup>. The spread clustered distribution of Sema3A has been attributed to the presence of secreted Sema3A linked to the proteoglycans of the extracellular matrix<sup>29-31</sup>. Similarly, Sema3A puncta detected in the muscle cell layer and in the myenteric plexus could correspond to secreted Sema3A trapped in the extracellular matrix. The cellular source of Sema3A in the gut remains incompletely characterized. In situ hybridization studies for Sema3A mRNA performed in E14.5 mouse embryo and in 3-day-old mice indicated that Sema3A-synthesizing cells were detected with the inner mesenchyme, probably associated with the longitudinal muscle cell layer, but absent from the ENS<sup>23,24</sup>. Accordingly, we observed in our study that a few muscle cells exhibited a higher concentration of Sema3A labeling with a more uniform pattern, a distribution consistent with a Sema3A biosynthesis by these cells. We found that the receptor NRP1 was associated with enteric neurons, in particular with their axonal arbor. Altogether, the cellular distribution of Sema3A and NRP1 in the rat distal colon suggests that Sema3A produced and secreted by muscle cells would act on the axons of NRP1-expressing enteric neurons.

The tissue expression and distribution of Sema3A and NRP1 observed in this study between 1 and 36 days supports the possibility that Sema3A/NRP1 signaling might contribute to the shaping of neuronal circuitry during this period. Indeed, major changes in ENS structure occur during the early postnatal period, including gangliogenesis, axonal outgrowth, patterning of axonal fibers in interganglionic bundles and synapse formation<sup>10-14</sup>. These changes in neuronal morphology and connectivity are thought to be controlled by a combination of stimulatory and inhibitory signals resulting ultimately in the proper patterning of the enteric neuronal network. Using *in vitro* and *ex vivo* models of developing ENS, we found that Sema3A reduced axonal outgrowth and the size of synaptic clusters of enteric neurons suggesting that Sema3A is part of the inhibitory molecular repertoire involved in the shaping of neuronal connectivity during the postnatal period. Most of the effects induced by Sema3A have been shown in previous studies to be mediated via a receptor complex that contains NRP1, as the ligand binding subunit, and one of the four Plexin A

coreceptors, as the signal-transducing subunit<sup>32</sup>. Due to its ligand binding function, NRP1 is considered to be an obligatory receptor for the transduction of Semaphorin 3A-induced signaling. Our findings showed that NRP1 was strikingly present at growth areas of developing axons, such as neurite tips and buds as well as thin axonal protrusions, supporting the hypothesis that

Semaphorin 3A regulates axon development in enteric neurons through interaction with NRP1. The analyses of Semaphorin 3A and NRP1 distribution in 7 day-old rats suggested that Semaphorin 3A could be released by muscle cells, diffuse to the myenteric plexus and bind to axon-associated NRP1. Considering the particular topological organization of ENS, such as enteric neuron cell bodies and axons have to be kept in the gut wall along the whole length of the tract, one could envision that the inhibitory activity of Semaphorin 3A on axonal outgrowth could avoid ectopic axonal projections in the muscle layers, thereby contributing to the maintenance of the neuronal meshwork within the myenteric plexus.

The inhibitory activity of Semaphorin 3A on axonal elongation and synaptic connectivity of enteric neurons is in agreement with previous studies reported in the central nervous system showing that several members of the class 3 semaphorins inhibit axon extension and synapse formation of hippocampal neurons, which was functionally translated into modulation of synaptic transmission<sup>33-36</sup>. In the peripheral nervous system, Semaphorin 3A has been shown to control the growth and navigation of spinal motor neuron axons to the muscle targets in the forelimb, therefore underlying the establishment of functional motor circuitry<sup>37</sup>. The Semaphorin 3A-induced regulation of enteric neuronal connectivity found in the present study could have major consequences on neurally-dependent gut functions, such as gastrointestinal motility. Indeed, it has been shown that anomalies in the ENS axonal tract configuration could result in severe bowel dysmotility<sup>9</sup> and that the complexity of neuronal connectivity correlated with intestinal motility pattern<sup>38</sup>. Whether Semaphorin 3A, by regulating enteric neuronal network, could control gut contractile activity remains to be demonstrated.

Previous studies pointed out a link between Semaphorin 3A and HSCR as deleterious mutations of Semaphorin 3A have been reported in some HSCR patients<sup>24,25</sup>. Furthermore, increased Semaphorin 3A protein expression have been described in the endothelin receptor-B null mouse model of HSCR and in the colon of some HSCR patients<sup>25,26,39</sup>. In our study, despite an average value of Semaphorin 3A signal intensity three times higher in Western blot for HSCR than ARM patients, we did not find any statistical difference in Semaphorin 3A protein level between the two groups. This might result from a large heterogeneity of Semaphorin 3A protein level in the HSCR group since variations up to 20-fold have been observed between individuals of this group. The variation of Semaphorin 3A expression level likely reflects the reported genetic and phenotypic heterogeneity of this population<sup>40</sup>. Regarding the expression of neuronal molecules, we found a marked reduction of the synaptic marker synapsin 1 in the colon of HSCR compared to ARM patients, while the pan-neuronal markers TuJ1 and PGP9.5 were unaffected. This result suggests that the main neuronal processes are preserved, but that subtle disturbance in neuronal architecture and synaptic specializations might occur in HSCR. Synapsin 1 is a neuronal protein enriched in synaptic vesicles present in nerve terminals. The role of synapsin 1, mainly studied so far in the central nervous system, is linked to several key neuronal development stages and functions, such as axonal elongation, formation of

presynaptic terminals, regulation of the synaptic vesicle docking and synaptic transmission<sup>4143</sup>. Our results showing a decreased level of synapsin 1 in HSCR compared to ARM patients suggest that defects in synapse formation or synaptic transmission in between neurons or with gut target cells might occur in HSCR. Previous studies have also reported ENS abnormalities in the ganglionic segment of HSCR patients, such as the overexpression of polysialylated neural cell adhesion molecules, used as a marker of neuronal immaturity<sup>44</sup>. These data, with our present results, suggest that impaired ENS maturation and connectivity might occur in the normoganglionic gut of HSCR which could contribute to altered gastrointestinal functions, such as motility disturbance often reported in HSCR patients, even after surgery.

Interestingly, we found a negative correlation between Sema3A and synapsin 1 protein expression level in the colon of HSCR patients. In view of our results showing an inhibitory activity of Sema3A on axonal outgrowth and on the size of synaptic clusters, one hypothesis is that the level of Sema3A expression might regulate Sema3A-activating pathways and therefore control the wiring of neuronal circuitry and synaptic connections. So far, the functional consequences of altered Sema3A expression on gut physiology are unknown but the lack of Sema3A in fetal mice induced a premature entry of sacral neural crest-derived cells into the hindgut<sup>23</sup>. However, knockdown of Sema3A during Zebrafish embryogenesis had no effect on the number of enteric neurons in the gut at embryonic stage<sup>24</sup>. Whether impaired Sema3A-activated signaling during the postnatal period induces defects in the maturation of neuronal connectivity remains to be determined. However, based on our results, one could envisage that defects in Sema3A signaling might impact the pattern of axonal projection and neuronal connections in between neurons and with gut target cells established during ENS postnatal development. We propose that altered signaling of Sema3A-activating pathways could contribute to a deficiency in the shaping of the neuronal circuitry, leading to persistent motility disturbance as seen in HSCR.

## Methods

### Study approval

For study involving rat samples, all experimental protocols were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations after obtaining the approval by the French Ministry of Research (Agreement # 02476.03). For studies involving human samples, parents or the legal guardians gave a written informed consent prior to inclusion in the study. This study received IRB approval by Nantes Ethical Committee under protocol number 12-162014. The database is in compliance with the requirements of the French data protection authority (CNIL, 08/07/2015-n°915187) and registered by the French Ministry of Research under protocol 03/05/2015-n°15.071bis. The EnteHirsch biobank was approved by the Clinical Ethics Committee (CPP Ouest IV of Nantes, 11/09/2014-n°DC-2011-1399).

### Human colon tissues

Nine HSCR patients (6 boys), with a short-segment HSCR born after 37 weeks of gestation and aged between 17 and 222 days of life at the time of curative surgery were included in pediatric surgery departments from eight French hospitals: Nantes, Brest, Poitiers, Angers, Le Mans, Tours, Armand Trousseau and Necker (Paris). Nine patients (6 boys) with a diagnosis of colorectal malformation (ARM) requiring a colostomy creation or closure before one year of age (between 35 and 287 days of life) and born after 37 weeks of gestation were included and considered in our study as a comparison group. ARM is a congenital colorectal malformation related to abnormal anal sphincter and pelvic muscular complex inherent to this developmental disorder, but probably unrelated to an underlying gastrointestinal motility or ENS dysfunction. Specimens of resected bowel were collected at the time of surgery from the ganglionated zone (confirmed by double histopathological reading) in HSCR patients and from the proximal stoma in ARM. They were placed immediately in sterile Hank's balanced salt solution (HBSS) kept at 4 °C on ice. Mucosa and submucosa were separated from the muscular tissue by microdissection. Samples were placed immediately in liquid nitrogen, stored at -80 °C.

### Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from the distal colon of 1-, 7-, 21- and 50-day-old rats using Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Hoerd, France) and the resulting RNAs were reversetranscribed using SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using a StepOne thermocycler with a FastSybr green mastermix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sense and anti-sense oligonucleotide primers used were as follows: rat *Sema3A* sens: 5'-

TACTGCAAAGAGGGCGCACAA-3', antisens: 3'-GGCTCTCTGTGACTTCGGAC-5'; rat NRP1 sens: 5'-CAGCGATAAATGTGGCGGGA-3', antisens: 3'-GTCATACTTGCAGTCTCTGTCCTC-5'. Internal controls were generated by amplifying the ribosomal protein S6 gene (S6) mRNA. The relative expression of the gene of interest was measured by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Analyses were performed on 5 animals for each studied age.

## Western blot

Distal colon from 1-, 7-, 21- and 50-day-old rats and resected colon from HSCR and ARM patients were lysed in a solution containing 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA and protease inhibitors (Complete $\square$ ; Roche, France), pH 7.4, with a tissue homogenizer (Precellys 24, Bertin Technologies, France) and sonicated three times for 5 sec. For brain preparation, forebrains of 50-day-old rats were homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH8.0) and centrifuged at 20,000 *g* for 20 min to collect the supernatant. Equal amounts of lysate (10  $\mu$ g of proteins) were separated using the Invitrogen NuPage Novex 412% Bis-Tris MidiGels $\square$  and blotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were incubated overnight with a rabbit anti-Sema3A antibody (Santa Cruz, 1/500 for rat samples; 1/300 for human samples) or a goat anti-NRP1 antibody (R&D System, 1/2000 for rat samples; 1/500 for human samples), a mouse anti-class III  $\beta$ -tubulin (TuJ1; Abcam, 1/1000), a rabbit anti-PGP9.5 (Invitrogen, 1/400) and a rabbit anti-synapsin 1 (Sigma, 1/1000). Proteins were detected by the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies

(Thermoscientific, 1/5000) using chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, BioRad) and Bio-Rad Gel-Doc imaging system. The value of Sema3A and NRP1 signal was normalized to the amount of  $\beta$ -actin, detected with a mouse anti  $\beta$ -actin antibody, (Sigma, 1/5000) and expressed as a percentage of the average of controls.

## Immunofluorescence staining

*Tissue.* Segments of distal colon from 1, 7- and 36-day-old rats were fixed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature (RT) for 3 h. Whole mounts of longitudinal muscle and myenteric plexus (LMMP) were obtained by microdissection and were permeabilized with PBS containing 10% BSA, 0.5% Triton X-100 and 0.01 % sodium azide for 2h at RT. Tissues were then incubated with the following primary antibodies: rabbit anti-Sema3A (Santa Cruz, 1/200), goat anti-NRP1 (R&D System, 1/33), mouse anti- $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, Abcam, 1/500), mouse or rabbit anti-TuJ1 (Sigma or Abcam respectively, 1/1000), mouse anti-S100 $\beta$  (Abcam, 1/500), anti-Hu C/D (HU,) and mouse or rabbit anti-HuC/D (HU; Molecular Probes or Santa Cruz respectively, 1/500) diluted in PBS containing 3% BSA, 0.25 % Triton X-100 and 0.01 % sodium azide for 16h at RT. After washing, tissues



were incubated for 2h at RT with the appropriate Alexa 488-, Cy3-, Cy5- or Alexa 647-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch), and then incubated for 5 min in DAPI (ThermoFisher Scientific, 1/5000 and mounted with ProLong Gold Antifade Reagents (ThermoFisher Scientific).

**Cell culture and gut explant.** Cells or gut explants were fixed in PBS containing 4% PFA for 15 min, permeabilized for 5 min in PBS containing 0.25% TritonX-100 and incubated in PBS containing 10% BSA and 0.01 % sodium azide for 30 min at RT. The cells were then incubated with the following primary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA and 0.01% sodium azide: goat anti-NRP1 (1/500), mouse anti-TuJ1 (1/500) or guinea-pig anti-synapsin 1 (Synaptic Systems, 1/700) for 16h at RT. After washing, cells were incubated for 1h30 min at RT with the appropriate Alexa 488- or Cy3-conjugated secondary antibodies, then for 5 min in DAPI 1/5000 and mounted with ProLong Gold Antifade Reagents.

## ENS culture

**Enteric neuron-glia coculture.** To study the cellular distribution of NRP1 in enteric neurons during development, we used a model of neuron-glia coculture as previously described<sup>11</sup>. First, enteric glial cells were prepared from ENS culture derived from the intestine of E15 rat embryos<sup>45</sup> and were plated at a density of 7,500 cells/cm<sup>2</sup> in a 24-well plate in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine and 50 µg/ml streptomycin and 50 UI/ml penicillin. After 4 days, the medium was replaced with serum-free Neurobasal/B27 medium (Gibco) 3h before neuron culture. Rat enteric neuron culture was prepared from the intestine of E15 rat embryos. Briefly, intestine were removed, finely diced in Hank's buffered salt solution and then triturated mechanically using a scalpel. Tissue fragments were incubated for 15 min with 0.25% trypsin (Invitrogen) and for 10 min with 0.1% DNase I (Sigma) and the dissociated cells were plated at 175,000 cells/cm<sup>2</sup> on glass coverslips coated with poly-L-lysine (1mg/ml, Sigma) in DMEM high glucose containing 10% FCS, 2 mM glutamine and antibiotics. The coverslips were then transferred 3h later to the wells containing the enteric glia and 3 µM of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Calbiochem) were added 24h later. The cells were maintained for up to 7 days.

**ENS culture in matrigel.** To study the effects of Sema3A on enteric neuron development, dissociated cells from E15 rat embryos were prepared as described above and were resuspended in BD matrigel matrix (Corning #356234) at a concentration of 50,000 cells/ µl, from which 3 µl were loaded in the center of a well of a 24-well plate previously coated with matrigel diluted 1/100 in Neurobasal medium. Three µl of transfected COS cells resuspended in BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (Corning #356230) (50,000 cells/ µl) were then loaded 3 mm distant from the ENS matrigel dot. The ENS-COS cells preparation in matrigel dots was cultured in Neurobasal/B27 medium containing antibiotics and 50 ng/ml GDNF for 4 days.

## **Gut explants**

The intestine of E15 rat embryos was dissected and cut into 6 equal pieces. Each piece was transferred to a well of a 24-well plate previously coated with 0.05 mg/ml collagen diluted in 20 mM acetic acid. The explants were cultured in DMEM high glucose (Gibco) containing 50 ng/ml GDNF, 10 % FCS, 2 mM glutamine and antibiotics. After 1 day of culture, 3  $\mu$ l of transfected COS cells resuspended in BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (50,000 cells/  $\mu$ l) were loaded 5 mm distant from the explant. The gut explant-COS cells preparation was maintained for 3 more days.

## **COS cell culture and transfection**

COS-7 cells were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics. Transfections with eGFP or Sema3A plasmids were performed using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). To perform a COS cell suspension in matrigel, the cells were gently scrapped one day after the transfection and homogenised in matrigel at a concentration of 50,000 cells/ $\mu$ l as described above.

## **Image analysis and quantification**

For whole-mount tissues, serial optical sections along the z-axis separated by 0.3  $\mu$ m were acquired with a Nikon A1RSi confocal microscope, using appropriate laser wavelength and filters, with 20x/0.75 or 60x/1.4 oil immersion objectives. Images were processed with the Image J software (NIH, Bethesda, MD). Images of gut explants and ENS cultures were acquired with a digital camera (DP50, Olympus) coupled to a fluorescence microscope (BX51, Olympus) using x20 or x100 oil immersion objectives.

Images quantification was performed with the ImageJ software program. For ENS cultured in matrigel, the axonal outgrowth was measured by counting the number of axon extending out of the matrigel dot (Fig. 4A). Eight matrigel dots were analyzed from 4 independent experiments. For gut explants cultures, the wavefront of the enteric neurons migration and the border of axonal extension were traced according to the Hu and TuJ1 immunostaining respectively. The thickness of the neuron cell body layer corresponded to the distance between the explant border and the wavefront of neuron cell body migration. The thickness of the axonal layer corresponded to the distance between the enteric neurons migration wavefront and the border of axonal extensions (Fig. 4D). The thickness of the neuron cell body layer and of the axonal layer was measured in seven explants per conditions from 3 independent experiments. To determine the number and area of synapsin 1 clusters, images were acquired with InCell Analyzer 2200 microscope (GE Healthacre) using a x20 objective. The same exposure time was used for all conditions, thereby ensuring accurate comparisons. The number of synapsin clusters per surface unit of TuJ1 immunostaining was determined with ImageJ software in 4 randomly selected zones for each gut

explants (n=5). The fluorescence intensity threshold for clusters was defined as at least 2.5 times the average intensity of fluorescence in the underlying neuronal process as previously described<sup>46</sup>.

### Statistics

Data analysis and statistics were performed using Excel and GraphPad Prism 5. Values indicated mean  $\pm$  s.e.m. Group comparison was made by Mann-Whitney Test or KruskalWallis Test with Dunn's *post-hoc* test as indicated. Correlations between variables were assessed by Spearman's correlation coefficients, as appropriate. The level of statistical significance was set at \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## References

- Schemann, M. & Neunlist, M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1, 55-59, doi:10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x (2004).
- Burns, A. J. & Pachnis, V. Development of the enteric nervous system: bringing together cells, signals and genes. *Neurogastroenterol Motil* 21, 100-102, doi:10.1111/j.13652982.2008.01255.x (2009).
- Gershon, M. D. Developmental determinants of the independence and complexity of the enteric nervous system. *Trends in neurosciences* 33, 446-456, doi:10.1016/j.tins.2010.06.002 (2010).
- Enomoto, H. *et al.* GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21, 317-324 (1998).
- Hao, M. M. *et al.* The role of neural activity in the migration and differentiation of enteric neuron precursors. *Neurogastroenterol Motil* 22, e127-137, doi:10.1111/j.13652982.2009.01462.x (2010).
- Uesaka, T. *et al.* Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype. *Development* 134, 2171-2181, doi:10.1242/dev.001388 (2007).
- Uesaka, T., Nagashimada, M. & Enomoto, H. GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 16372-16382, doi:10.1523/JNEUROSCI.2079-13.2013 (2013).
- Chalazonitis, A. *et al.* Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates postnatal development of enteric dopaminergic neurons and glia via BMP signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 13746-13757, doi:10.1523/JNEUROSCI.1078-11.2011 (2011).
- Sasselli, V. *et al.* Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *The Journal of clinical investigation* 123, 1763-1772, doi:10.1172/JCI66759 (2013).
- Foong, J. P., Nguyen, T. V., Furness, J. B., Bornstein, J. C. & Young, H. M. Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J Physiol* 590, 2375-2390, doi:10.1113/jphysiol.2011.225938 (2012).
- Le Berre-Scoul, C. *et al.* A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol* 595, 583-598, doi:10.1113/JP271989 (2017).
- Roberts, R. R., Murphy, J. F., Young, H. M. & Bornstein, J. C. Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G930-938, doi:10.1152/ajpgi.00444.2006 (2007).
- Parathan, P., Wang, Y., Leembruggen, A. J., Bornstein, J. C. & Foong, J. P. The enteric nervous system undergoes significant chemical and synaptic maturation during adolescence in mice. *Developmental biology*, doi:10.1016/j.ydbio.2019.10.011 (2019).

- de Vries, P., Soret, R., Suply, E., Heloury, Y. & Neunlist, M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G539-547, doi:ajpgi.00092.2010 [pii]10.1152/ajpgi.00092.2010 (2010).
- Fu, M., Lui, V. C., Sham, M. H., Pachnis, V. & Tam, P. K. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *The Journal of cell biology* 166, 673-684, doi:10.1083/jcb.200401077 (2004).
- Jin, S., Martinelli, D. C., Zheng, X., Tessier-Lavigne, M. & Fan, C. M. Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E73-80, doi:10.1073/pnas.1418629112 (2015).
- Sanchez, M. P. *et al.* Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 70-73, doi:10.1038/382070a0 (1996).
- Wang, H. *et al.* The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 1523-1538, doi:10.1523/JNEUROSCI.3861-09.2010 (2010).
- Zeng, F., Watson, R. P. & Nash, M. S. Glial cell-derived neurotrophic factor enhances synaptic communication and 5-hydroxytryptamine 3a receptor expression in enteric neurons. *Gastroenterology* 138, 1491-1501, doi:10.1053/j.gastro.2009.11.048 (2010).
- Pasterkamp, R. J. Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nature reviews. Neuroscience* 13, 605-618, doi:10.1038/nrn3302 (2012).
- Tamamaki, N., Fujimori, K., Nojyo, Y., Kaneko, T. & Takauji, R. Evidence that *Sema3A* and *Sema3F* regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *The Journal of comparative neurology* 455, 238-248, doi:10.1002/cne.10476 (2003).
- Goshima, Y., Yamashita, N., Nakamura, F. & Sasaki, Y. Regulation of dendritic development by semaphorin 3A through novel intracellular remote signaling. *Cell adhesion & migration* 10, 627-640, doi:10.1080/19336918.2016.1210758 (2016).
- Anderson, R. B. *et al.* Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: a role for *Sema3A*, but not *Sema3F*. *Developmental biology* 305, 287-299, doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.020 (2007).
- Jiang, Q. *et al.* Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with *ret* are critical to Hirschsprung disease liability. *American journal of human genetics* 96, 581-596, doi:10.1016/j.ajhg.2015.02.014 (2015).
- Luzon-Toro, B. *et al.* Mutational spectrum of semaphorin 3A and semaphorin 3D genes in Spanish Hirschsprung patients. *PLoS One* 8, e54800, doi:10.1371/journal.pone.0054800 (2013).
- Wang, L. L. *et al.* Semaphorin 3A expression in the colon of Hirschsprung disease. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 91, 842-847, doi:10.1002/bdra.20837 (2011).
- Cheng, L. S., Schwartz, D. M., Hotta, R., Graham, H. K. & Goldstein, A. M. Bowel dysfunction following pullthrough surgery is associated with an overabundance of nitrergic neurons in Hirschsprung disease. *Journal of pediatric surgery* 51, 1834-1838, doi:10.1016/j.jpedsurg.2016.08.001 (2016).

Good, P. F. *et al.* A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* 91, 716-736, doi:10.1111/j.14714159.2004.02766.x (2004).

De Wit, J., De Winter, F., Klooster, J. & Verhaagen, J. Semaphorin 3A displays a punctate distribution on the surface of neuronal cells and interacts with proteoglycans in the extracellular matrix. *Mol Cell Neurosci* 29, 40-55, doi:10.1016/j.mcn.2004.12.009 (2005).

de Wit, J., Toonen, R. F., Verhaagen, J. & Verhage, M. Vesicular trafficking of semaphorin 3A is activity-dependent and differs between axons and dendrites. *Traffic* 7, 1060-1077, doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00442.x (2006).

Zimmer, G. *et al.* Chondroitin sulfate acts in concert with semaphorin 3A to guide tangential migration of cortical interneurons in the ventral telencephalon. *Cerebral cortex* 20, 2411-2422, doi:10.1093/cercor/bhp309 (2010).

Zhou, Y., Gunput, R. A. & Pasterkamp, R. J. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends in biochemical sciences* 33, 161-170, doi:10.1016/j.tibs.2008.01.006 (2008).

Bouzioukh, F. *et al.* Semaphorin3A regulates synaptic function of differentiated hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* 23, 2247-2254, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04783.x (2006).

Sahay, A. *et al.* Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 3613-3620, doi:10.1523/JNEUROSCI.5255-04.2005 (2005).

Shelly, M. *et al.* Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron* 71, 433-446, doi:10.1016/j.neuron.2011.06.041 (2011).

Wang, N., Dhumale, P., Chiang, J. & Puschel, A. W. The Sema3A receptor Plexin-A1 suppresses supernumerary axons through Rap1 GTPases. *Sci Rep* 8, 15647, doi:10.1038/s41598-018-34092-5 (2018).

Huber, A. B. *et al.* Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron* 48, 949-964, doi:10.1016/j.neuron.2005.12.003 (2005).

Li, Z. *et al.* Regional complexity in enteric neuron wiring reflects diversity of motility patterns in the mouse large intestine. *eLife* 8, doi:10.7554/eLife.4266910.7554/eLife.42914 (2019).

Fujiwara, N., Miyahara, K., Nakazawa-Tanaka, N., Akazawa, C. & Yamataka, A. Increased expression of Semaphorin 3A in the endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung disease. *Journal of pediatric surgery* 53, 326-329, doi:10.1016/j.jpedsurg.2017.11.034 (2018).

Hofstra, R. M., Osinga, J. & Buys, C. H. Mutations in Hirschsprung disease: when does a mutation contribute to the phenotype. *European journal of human genetics : EJHG* 5, 180185 (1997).

Chin, L. S., Li, L., Ferreira, A., Kosik, K. S. & Greengard, P. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9230-9234, doi:10.1073/pnas.92.20.9230 (1995).

Li, L. *et al.* Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9235-9239, doi:10.1073/pnas.92.20.9235 (1995).

Terada, S., Tsujimoto, T., Takei, Y., Takahashi, T. & Hirokawa, N. Impairment of inhibitory synaptic transmission in mice lacking synapsin I. *The Journal of cell biology* 145, 10391048, doi:10.1083/jcb.145.5.1039 (1999).

Miyahara, K. *et al.* Neuronal immaturity in normoganglionic colon from cases of Hirschsprung disease, anorectal malformation, and idiopathic constipation. *Journal of pediatric surgery* 44, 2364-2368, doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.07.066 (2009).

Van Landeghem, L. *et al.* Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, G976-987, doi:10.1152/ajpgi.00427.2010 (2011).

Louveau, A. *et al.* Impaired spatial memory in mice lacking CD3zeta is associated with altered NMDA and AMPA receptors signaling independent of T-cell deficiency. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 1867218685, doi:10.1523/JNEUROSCI.3028-13.2013 (2013).

## **Acknowledgements**

We thank Drs. A. Chedotal and V. Castellani for the gifts of cDNAs. We are grateful to T Durant for help in cell culture. We also thank the EnteHirsch Consortium for human sample collection. This work was supported by Inserm, Fondation LCL, Fondation SantéDige and Fondation pour la Recherche Médicale. The authors disclose no conflicts of interest.

## **Author contributions**

JG, MN and HB designed the research study. JG, CLBS, AD and PB performed experiments. JG, CLBS, PB and HB analyzed the data. HB supervised the study and wrote the paper. JG and MN participated in the critical reading of the manuscript.

## **Competing interests**

The authors declare no competing interests.



## Figure Legends

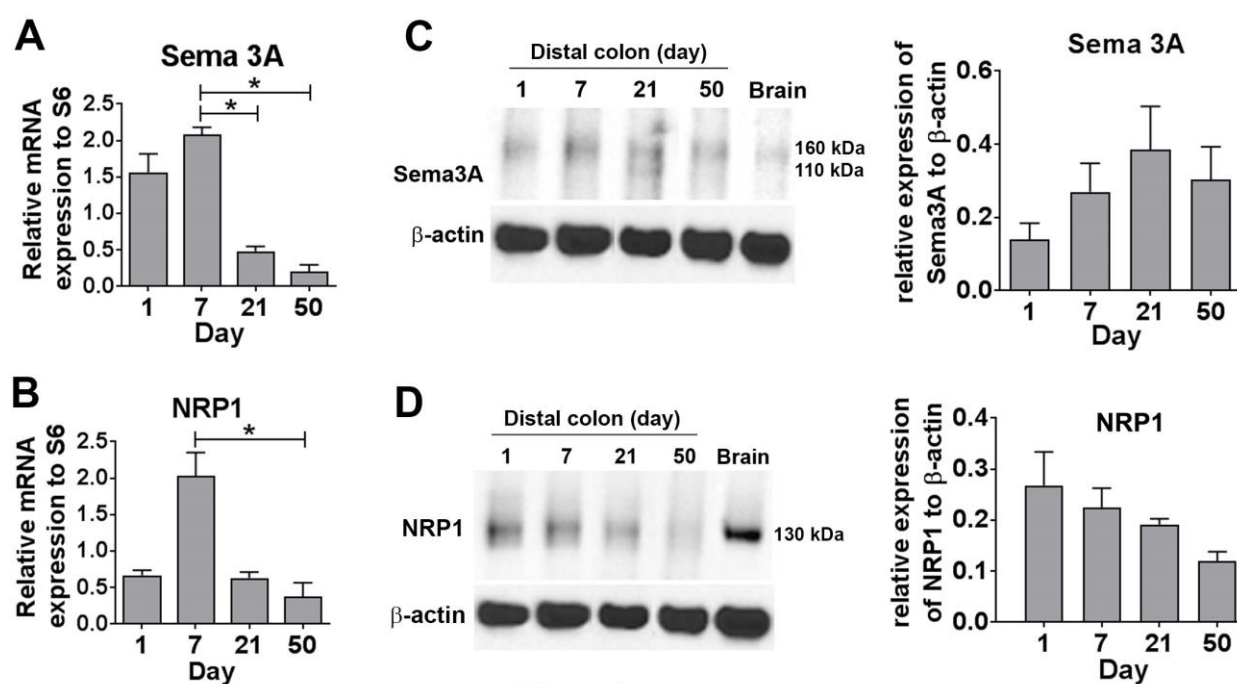
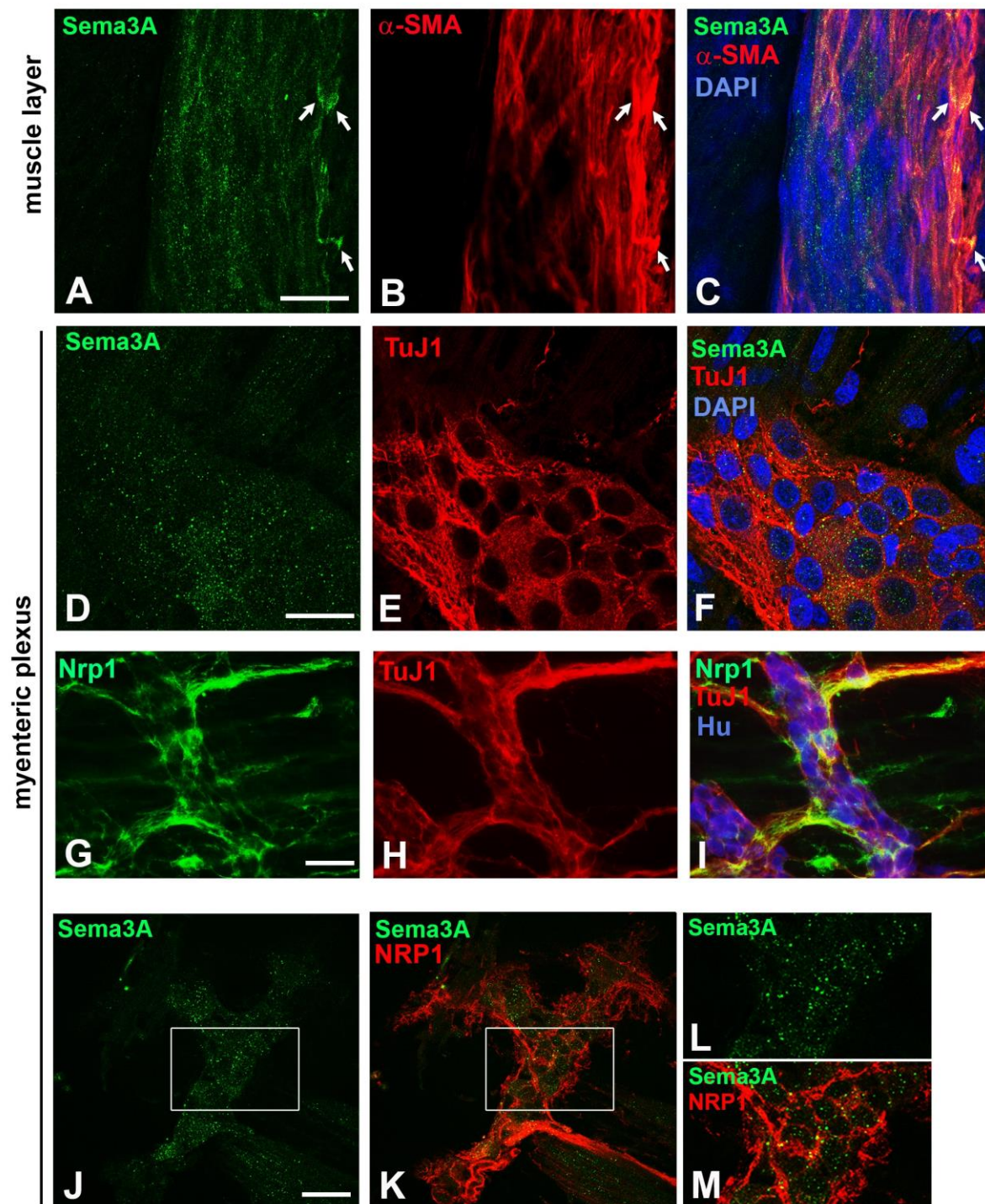


Figure 1

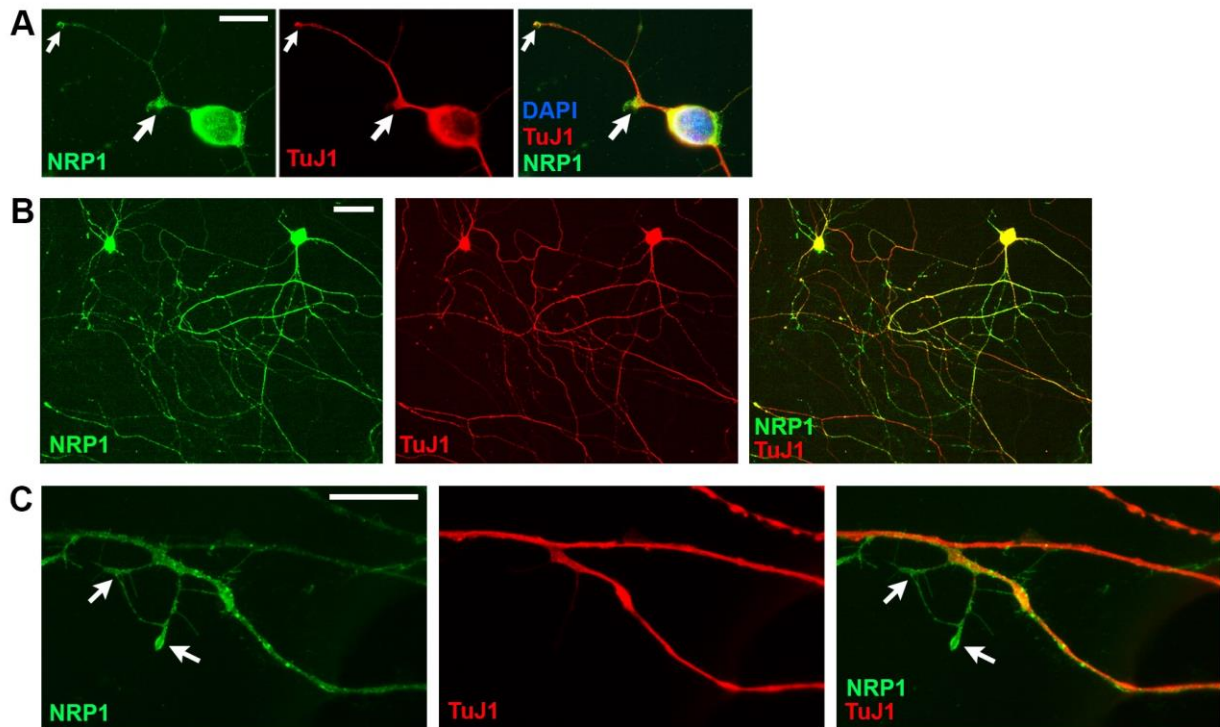
**Figure 1. The expression of Sema3A and NRP1 is developmentally regulated in the rat colon.** (A,B) PCR amplification of Sema3A (A) and NRP1 (B) mRNA extracted from rat colon at 1, 7, 21 and 50 days. Expression levels are normalized to the ribosomal S6 gene. Data represent means  $\pm$  s.e.m. (n=5). \* $p$ <0.05, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. (C,D) Western blot of distal colon lysates prepared from rats at 1, 7, 21 and 50 days and of adult rat brain as positive control. For each sample, 10  $\mu$ g of proteins were loaded on a 412% LDS-NuPage and immunoblotted with antibodies against Sema3A (C) or NRP1 (D) and  $\beta$ -actin. The quantification of the Sema3A and NRP1 signal intensity was normalized to  $\beta$ actin signal in the same sample. Data represent means  $\pm$  s.e.m. (n=3-5).



**Figure 2**

**Figure 2. Sema3A and NRP1 are both associated with ganglia in the myenteric plexus of the distal colon in 7- and 36-day-old rats.** (A,B,C) Double immunolabeling for Sema3A (A,C in green) and  $\alpha$ -SMA (marker for muscle cells; B,C in red) in the muscle layer of 8-dayold rat distal colon. Cell nuclei are labeled with DAPI. Sema3A immunostaining appears as numerous small puncta throughout the tissue, closed to muscle cells. In some instances, a higher concentration of Sema3A labeling, more uniformly distributed, is associated with muscle cells

(arrows). (D,E,F) Double immunolabeling for Sema3A (D,F in green) and TuJ1 (marker for neuronal soma and axonal processes; E,F in red;) in the myenteric plexus of 8day-old rat distal colon. Cell nuclei are labeled with DAPI. (G,H,I) Triple immunolabeling for NRP1 (G,I in green), TuJ1 (H,I in red) and Hu (marker for neuronal soma, I in blue) in the myenteric plexus of 7-day-old rat distal colon. (J,K) Double immunolabeling for Sema3A (J, in green) and NRP1 (K, in red) in the myenteric plexus of 36-day-old rat distal colon. (L,M) Higher magnification of the boxed regions in J,K. Scale bars: A,B,C,D,E,F: 15  $\mu$ m; G,H,I,J,K: 50  $\mu$ m.



**Figure 3**

**Figure 3. NRP1 is enriched at growth areas of developing enteric neurons in rat primary cultures** (A) Double immunolabeling for NRP1 (green) and TuJ1 (red) at 1 day of culture. NRP1 is enriched at the tips (small arrow) and buds (large arrow) of the developing axons. Cell nuclei are labeled with DAPI. Scale bar, 12  $\mu$ m. (B,C) Double immunolabeling for NRP1 (green) and TuJ1 (red) at 7 days of culture. NRP1 is widely localized in the profuse network of TuJ1-immunoreactive axons as well as with thin extending axonal ramifications (arrows in C). Scale bars, A: 12  $\mu$ m; B: 30  $\mu$ m; C: 14  $\mu$ m.

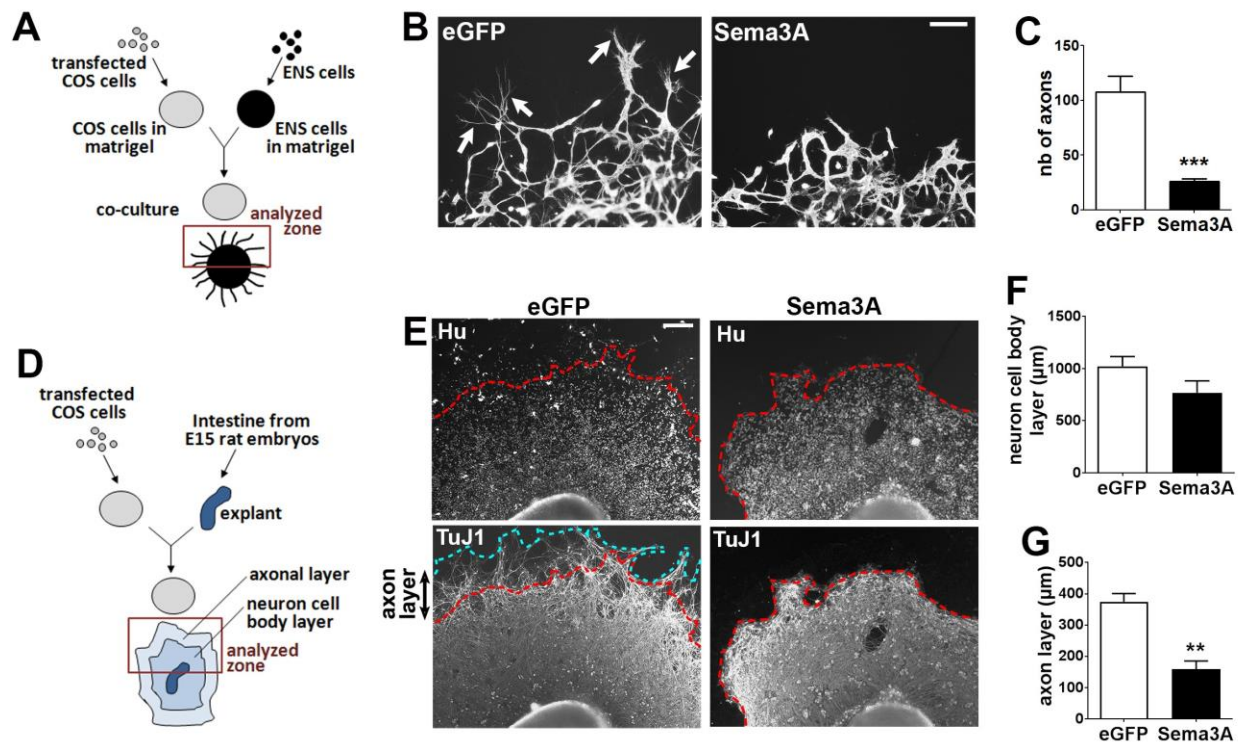


Figure 4

**Figure 4. Sema3A inhibits axonal outgrowth in dissociated cell cultures and gut explants.** (A) Schematic illustrating the coculture of enteric neurons with transfected COS cells in matrigel. (B) Enteric neurons aggregated in matrigel were co-cultured with eGFP- or Sema3A-transfected COS cells and were immunolabeled for TuJ1. In cocultures with eGFP-transfected COS cells, numerous axonal fibers extend out of the matrigel dot (arrows). Scale bar, 100 μm. (C) Quantification of the number of axons extending outside the matrigel dot.

Data represent means ± s.e.m. (n=8 from 4 independent experiments); \*\*\*p=0.0002, Mann-Whitney test. (D) Schematic illustrating the coculture of gut explants with transfected COS cells in matrigel. (E) Gut explants co-cultured with eGFP- or Sema3A-transfected COS cells were immunolabeled for Hu and TuJ1. The dotted red line corresponds to the enteric neurons migration wavefront from the explant. The dotted blue line corresponds to the border of axonal projections. Scale bar, 250 μm. (F) Quantification of the thickness of the neuronal cell body layer. (G) Quantification of the thickness of the axonal layer. Data represent means ± s.e.m. (n=7 from 3 independent experiments); \*\*p=0.0012, Mann-Whitney test.

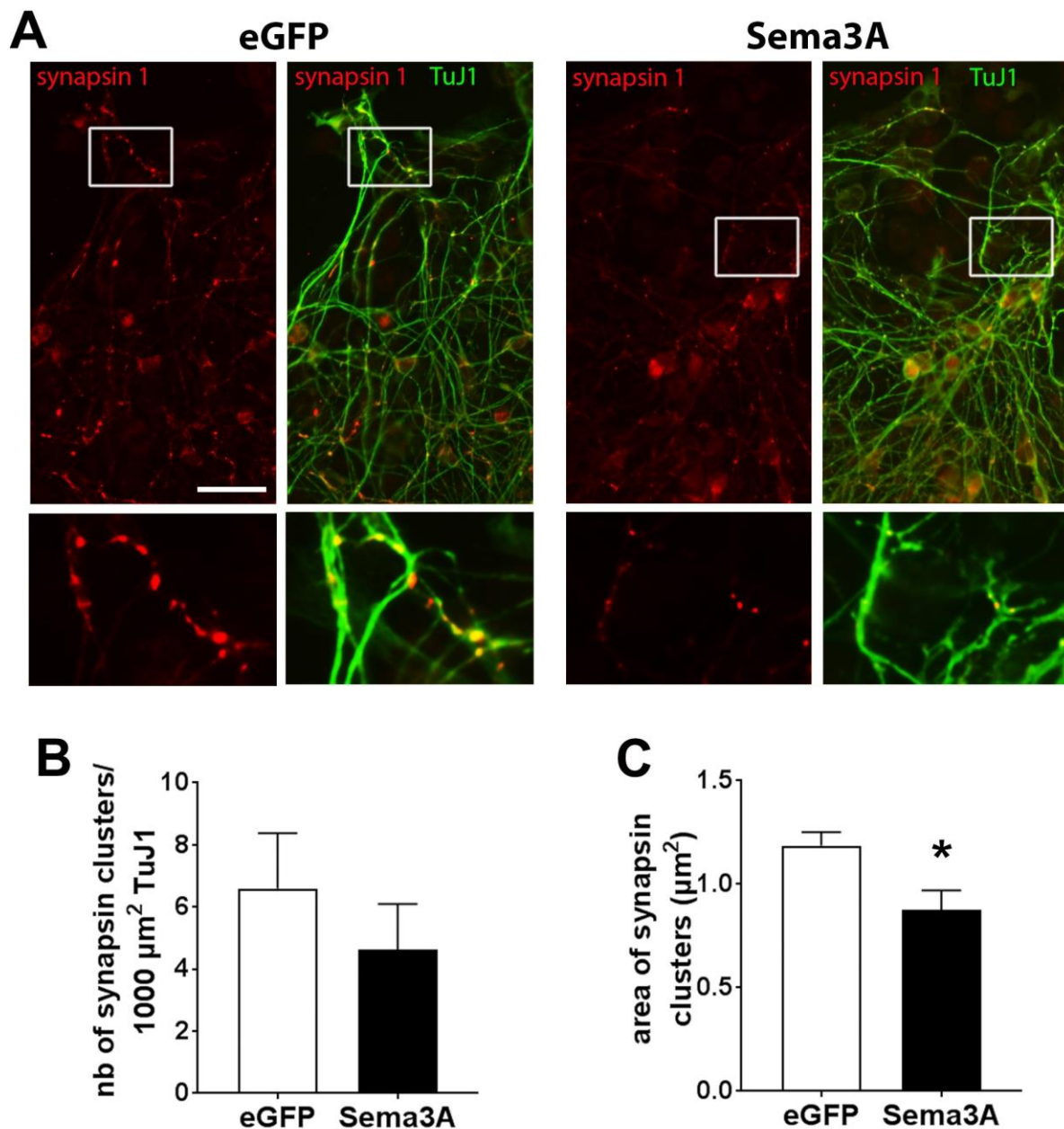


Figure 5

**Figure 5. Sema3A restrains the size of synapses.** (A) Gut explants cocultured with eGFP- or Sema3A-expressing COS cells were immunolabeled with synapsin 1 and TuJ1 antibodies.

Images at the bottom represent higher magnification of the boxed region. Scale bar, 35  $\mu\text{m}$ . (B,C) Quantification of the number of synapsin 1 clusters per 100  $\mu\text{m}^2$  of TuJ1 labeling (B) and area of synapsin 1 clusters (C). Data are mean  $\pm$  s.e.m. (n=5); \*p=0.032, Mann-Whitney test.

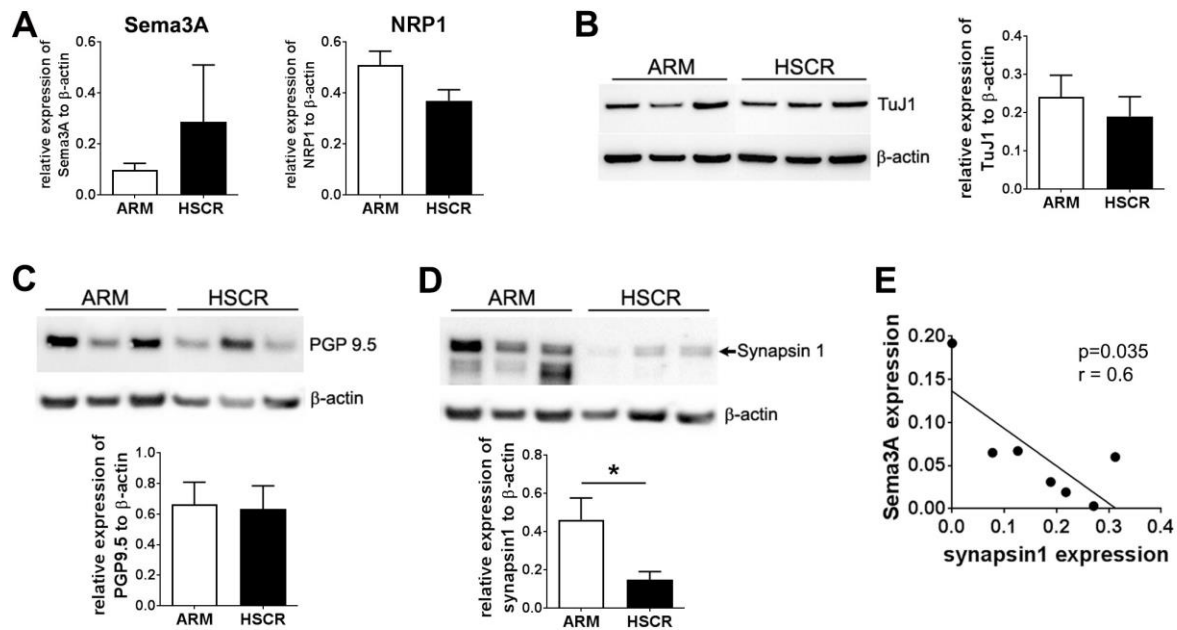


Figure 6

**Figure 6. The reduced level of synapsin 1 in HSCR colon is inversely correlated with Sema3A expression.** (A) Quantification by Western blot of Sema3A and NRP1 protein level normalized to  $\beta$ -actin. Data represent means  $\pm$  SEM (n=8-9). (B,C,D) Western blot of sigmoid colon of three representative ARM and HSCR patients with the corresponding quantification for TuJ1 (B), PGP9.5 (C) and synapsin 1 (D). Data represent means  $\pm$  s.e.m. (n=8-9). \*p=0.035, Mann-Whitney test. (E) Linear regression analysis between Sema3A and synapsin 1 expression in HSCR colon; p=0.035, Spearman's test.

**Article 2 :**

**Fecal supernatant from individuals with autism spectrum disorder induced impaired digestive functions and remodeling of the intestinal epithelial barrier and enteric nervous system**

**Fecal supernatant from individuals with autism spectrum disorder induced impaired digestive functions and remodeling of the intestinal epithelial barrier and enteric nervous system**

Jacques Gonzales<sup>1,2,3</sup>, Laetitia Aymeric<sup>1,3,4</sup>, Justine Marchix<sup>1,2,3</sup>, Marie Burel<sup>1,2</sup>, Catherine Le Berre-Scoul<sup>1,2,3</sup>, Alexandru Gaman<sup>5,6,7</sup>, Françoise Le Vacon<sup>8</sup>, Marion Leboyer<sup>5,6,7</sup>, Hélène Boudin<sup>\*1,2,3</sup>, Michel Neunlist<sup>\*1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Inserm U1235, NANTES, France, <sup>2</sup>Université de Nantes, Nantes, France, <sup>3</sup>Institut des Maladies de l'Appareil Digestif - IMAD, Nantes, France, <sup>4</sup>Université d'Angers, Angers, France, <sup>5</sup>INSERM U955 Psychiatrie Translationnelle, Créteil, France, <sup>6</sup>CHU Albert-Chenevier-Mondor, Créteil, France, <sup>7</sup>Fondation FondaMental, Créteil, France, <sup>8</sup>BioFortis Mérieux NutriSciences, Saint-Herblain, France



## Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a heterogeneous group of neuro-developmental disorders causing life-long impairments defined by lack of social skills and empathy, communication deficits and by the presence of repetitive behaviors and restricted interests. Their prevalence has dramatically increased in the world, rising from 0.02 % in 1975 to about 1 % of general child population (Nevison et al., 2018). The pathophysiology of ASD remains to date largely unknown but appears to involve both genetic and environmental factors (Colvert et al., 2015; Kim & Leventhal, 2015). Although ASD is primarily considered as a brain disorder related to defects in development and neuronal connectivity (Zikopoulos & Barbas, 2013; d'Albis et al., 2018; Deneault et al., 2019; Holiga et al., 2019), other systems and organs have been reported to be also affected, in particular those within the gastrointestinal tract (Gillberg & Billstedt, 2000). Epidemiologic studies reported that 20-90% of children with ASD experienced a higher frequency of gastrointestinal (GI) symptoms including diarrhea, constipation, abdominal pain and bloating than in control children cohorts (Buie et al., 2010; Hologue et al., 2018). This wide range is likely due to differences in assessment of GI symptoms, the age of participants and context of the studies (retrospective vs. prospective, parental report vs. medical records, geographic region, nutrition). Further highlighting a link between ASD and GI disturbance is the correlation between the severity of autistic and GI symptoms, suggesting the existence of coincident brain and gut dysfunctions (Adams et al., 2011). In addition, several studies indicated altered intestinal permeability in a fraction of individuals with ASD (around 40 %) although others showed no modification (D'Eufemia et al., 1996; de Magistris et al., 2010; Dalton et al., 2014; Kushak et al., 2016). Analysis of duodenal biopsies from ASD children indicated altered expression of several tight junction-forming molecules which are central components for the intestinal barrier properties (Fiorentino et al., 2016). GI dysfunctions associated to ASD condition are also supported in animal studies conducted in either genetic or environmental models of ASD. In these models, altered colonic transit and permeability were observed along with behavioral defects in social interaction and repetitive behavior (Hsiao et al., 2013; Golubeva et al., 2017; Hosie et al., 2019). Despite the central importance of the enteric nervous system (ENS) in the control of GI functions, little is known about ENS structural or functional modifications in ASD. ENS is a complex network of enteric neurons and glia, organized as interconnected ganglia distributed all along the digestive tract. Changes in the number of enteric neurons or glia, neurotransmitter expression, excitability and neuronal connectivity have been associated with GI disorders (Sasselli et al., 2013; Dothel et al., 2015). Interestingly, in Parkinson's disease, a neurodegenerative disease affecting primarily the brain, but also associated with prominent GI symptoms, neuronal inclusions similar to those characterized in central neurons have been described in enteric neurons from colonic biopsies of Parkinsonian individuals (Lebouvier et al., 2008), suggesting that, in some cases, cerebral pathologies with digestive comorbidity might share common pathophysiological hallmarks in the CNS and ENS. However, no study on the ENS in ASD individuals have been reported so far, but genetic animal models of ASD described several abnormalities in ENS structure, such as changes in the number of enteric neurons and in the proportion of neurochemically-defined neuronal sub-types (Bernier et al., 2014; Margolis et al., 2016; Golubeva et al., 2017; Hosie et al., 2019). An additional important actor in the GI tract is

the gut microbiota, which is increasingly recognized as major player in regulating developmental processes and functions of both gut and brain in physiological as well as in several pathological conditions (Borre et al., 2014). A large number of studies have demonstrated changes in the composition of fecal microbiota and in the metabolomic profile of bacteria-derived compounds in the feces, urine and blood of ASD individuals compared to control individuals (Finegold et al., 2010; Gondalia et al., 2012; Wang et al., 2012; Kang et al., 2018). Supporting the importance of gut microbiota in ASD are results from clinical trials demonstrating significant improvement of ASD clinical scores and GI symptoms in ASD subjects after microbiota transfer therapy or prebiotic treatment (Kang et al., 2017; Grimaldi et al., 2018). In addition, specific bacteria species have shown effectiveness in reversing some of the behavioural and GI impairments in animal model of ASD (Hsiao et al., 2013; Buffington et al., 2016; Sgritta et al., 2019). The contribution of the microbiota in ASD etiology has been more directly addressed by the colonization of germ-free mice with fecal microbiota from ASD individuals. This microbiota transfer induced the core behavioral ASD symptoms in the offspring of the recipient mice (Sharon et al., 2019), but the consequences of microbiota transfer in the recipient mice themselves on their GI symptoms and behavior have not been explored yet. However, the ability of fecal microbiota from individuals with digestive diseases, such as irritable bowel syndrome (De Palma et al., 2017) or psychiatric diseases, such as schizophrenia (Zheng et al., 2019; Zhu et al., 2019) has been shown to induce in the colonized mice several symptoms relevant of these disorders. The active agents responsible of the FMT-induced effects in mice might include living and dead bacteria, their debris and metabolites, or even products of the donor human's cells. The ability of fecal filtered supernatant, thus devoid of bacteria, to transfer pathophysiological traits has been shown in inflammatory bowel disease (Dabek et al., 2011; Meelu et al., 2014), suggesting that factors present in fecal supernatant (FS), including bacterial-derived metabolites and components, could act as pathogenic mediators.

In order to explore whether feces from ASD individuals contain products contributing to GI dysfunctions, FS prepared from ASD individuals (FS-ASD) and control subjects (FS-HC) were administrated to antibiotic-treated mice and ENS primary cultures to study GI function and expression of key molecules for gut and ENS functions. We found that FS-ASD induced disturbance of the intestinal barrier integrity and changes in the expression of inflammatory, glial and neuronal molecules relative to treatment with FS-HC. Moreover, we have identified a bacterial metabolite product, the deoxycholic acid, to be overrepresented in FS-ASD and showed that this bacterial metabolite induced changes of neuronal molecules expression but in the opposite way of FS.

## Materials and Methods

### Ethics statement and study approval

Participants for this study were recruited through the Créteil University hospital and had all been previously enrolled at the Autism Expert Center at Créteil University Hospital. This study received IRB approval by Créteil Ethical Committee under protocol number xxx. The database is in compliance with the requirements of the French data protection authority (CNIL, date-n°xxx) and registered by the Research Ministry under protocol xxx. The BGI biobank was approved by the Clinical Ethics Committee (CPP xxx). Human samples were collected after obtaining a written informed consent from either the parents or the legal guardians prior to inclusion in the study. Participants were screened for eligibility criteria through questionnaires and sample collection kits were given to them.

C57BL/6RJ SPF mice (Janvier Laboratory, Le Genest Saint-Isle, France) were housed in a 12-hours light/dark cycle with ad libitum access to food and water. The investigators were accredited by the French National Veterinary Agency and the experiments were carried out in strict accordance with the recommendations of the local Animal Care and Use Committee of Nantes (France) and approved by the French Ministry of Research (Agreement #21485-201907151349898 v2).

### Subjects and feces collection

Thirty-eight ASD individuals (26 men, 12 women) and fifteen healthy controls (10 men, 5 women) aged between 18 and 50 years old at the time of feces collection were included at Hospital Henri Mondor (Créteil, France) and at Biofortis (Mérieux NutriSciences company, Saint-Herblain, France) respectively. Feces from ASD individuals were collected by individual at home with the GENbox anaer kit (ref 96124, Biomérieux), stored immediately at 4°C and brought to the Centre d'Investigation Clinique of Créteil hospital in less than 24 hours. Feces from healthy controls were collected by the individual at home in a collect-kit, immediately stored at 4°C and brought to the Biofortis company in less than 48 hours. Each sample was aliquoted by 1g tube and stored at -80°C before use.

### Fecal supernatant (FS) preparation

Feces were thawed on ice and then suspended in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) at the concentration of 1g/8mL. Samples were vortexed vigorously to homogenize the suspension and were centrifuged at 3,800 g for 15min at 4°C. The supernatants were filtered through a 20 µm cell strainer and then centrifuged at 13,000 g for 15 min at 4°C. The resulting supernatant was then filtered through a 0.22 µm filter, aliquoted and stored at -80°C.

## Bacterial derived-metabolite analysis

Dosage of bacterial derived-compounds were performed on FS-ASD and FS-HC. Short chain fatty acids (SCFA) and bile acids (BA) were quantified by mass spectrometry at the mass spectrometry platform of “Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest” (Nantes, France). Bacterial endotoxins were quantified using the Pierce<sup>TM</sup> Chromogenic Endotoxin Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, A39553) and read with an automatic microplate reader VarioSkan (Thermo Fisher Scientific, France).

## Mice treatment

C57BL/6RJ SPF mice of 7 weeks (Janvier Laboratory, Le Genest Saint-Isle, France). After one week of accommodation, mice were treated for 15 days with a mix of antibiotics and antifungals administrated by gavage for metronidazole (100 µg/g), vancomycin (50 µg/g), neomycin (100 µg/g) and amphotericin B (1 µg/g) or through the drinking water for ampicillin (1 g/l). At the end of the antibiotics treatment, enemas were performed with a 24-gauge cannula introduced in the rectum up to 5 mm and a volume of 20 µl/g of animal weight was injected slowly. Mice received enemas of HBSS (n=8), FS from ASD individuals (FS-ASD) (n=16) or FS from HC (FS-HC) (n=10). In a second experiment, mice treated with antibiotics received enema of deoxycholic acid (DCA; 5mM) dissolved in HBSS, at pH 9, every 12 hours for 48 hours (total of 5 enemas).

## In vivo intestinal motility

To assess the fecal pellets output (FPO) mice were placed individually in a clean cage without bedding, food and water and the number of pellets was counted for 2h. Fecal wet and dry weights were determined. The difference between wet and dry weights was used to calculate fecal water content. To assess the rate of transit time, mice received by gavage 5 µl/g of animal weight of a solution containing 60mg/mL carmin red and the length of the carmin red migration front along the intestine was measured after collection of the intestine 3h after the gavage.

## Intestinal permeability

*In vivo intestinal permeability.* Fluorescein-5.6 sulfonic acid (FSA) (0,4 kDa, Thermo Fisher Scientific, Saint-Aubin, France) and horseradish peroxidase (HRP, 44 kDa, Sigma Aldrich, France) were used as a marker of paracellular and transcellular permeability respectively. Mice received by gavage 5µL/g of animal weight of a solution containing 10 mg/mL FSA and HRP diluted in 0.5% of carboxy-methyl-cellulose. Blood was collected from the tail vein just before the gavage and after 2h. Plasma was isolated by centrifugation at 3,200 rpm for 10min at room temperature. FSA concentration was determined by measuring the fluorescence intensity of plasma using a spectrofluorometer (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, France). HRP activity

was determined by enzymatic assay in presence of Tetramethylbenzidine (TMB) substrate reagent set (BD OptEIA, San Diego, CA).

*Ex vivo intestinal permeability.* At the end of the *in vivo* analyses, mice were anesthetized with isoflurane in a sealed anesthetic chamber prior to cervical dislocation. The colon was removed and segments of proximal and distal colon were opened along the mesenteric border and mounted in Ussing Chambers (Easy Mount, Warner Instrument, Hamden, CT) in 2 mL of F12 supplemented Dulbecco's Modified Eagle medium (Thermo Fisher Scientific) containing 0,1% fetal bovine serum, 2 mM Glutamine and 45 g/L of NaHCO<sub>3</sub>. The medium was continuously oxygenated with a gas flow of 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37°C. After 30 min of equilibration, 200 µL of apical medium was replaced with 200 µL of medium containing FSA (1mg/mL) and HRP (3,75mg/mL). To evaluate permeability to FSA, the fluorescence levels of 150 µL aliquots taken at the basolateral side were measured at 30 min intervals over a period of 180 min using a spectrofluorometer. To assess permeability of HRP, 20µL aliquots from the basolateral side were recovered at 30 min intervals for 180 min and HRP activity was determined by enzymatic assay in presence of TMB substrate.

### **ENS primary culture and treatment**

Primary culture of rat ENS were generated from embryonic day 15 (E15) rat intestine as previously described (Chevalier et al., 2008). Briefly, intestines were minced using a scalpel and incubated for 15 min with 0.25 % trypsin (Invitrogen) and for 10 min with 0.1 % DNase I (Sigma) for cell dissociation. Cells were then plated at a density of 2.4 x 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> in DMEM/F12 containing penicillin/streptavidin and 10 % fetal bovine serum. After 24 h, the medium was replaced by DMEM/F12 containing 1% of N-2 supplement (Invitrogen) and primary cultures were maintained for 11 days. A day 9, cultures were treated for 48h with FS-ASD or FS-HC at the concentration of 1:500 and were lysed in RA1 lysis buffer (Macherey-Nagel, Germany), samples were stored at -80°C processed for RT-qPCR and Western blot as described below.

In order to evaluate the toxicity of fecal supernatant, ENS culture were treated with different concentration of FS and mitochondrial viability of cellular culture were evaluated by the MTT assay protocol. Briefly, cells were incubated with a solution of MTT (1mg/mL) in HBSS for 3H at 37°C. MTT solution was withdraw and DMSO 100% was used to lyse cells, then the optic density was read at 555nm with an automatic microplate reader VarioSkan (Thermo Fisher Scientific, France).

### **Preparation of mRNAs and proteins**

Mice colon or ENS cultures were lysed in RA1 buffer with the "Precellys 24" tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). The lysate was subjected to Nucleospin RNA II filters (Macherey Nagel, Hoerdt, France). The proteins were recovered from the flow-

through, precipitated and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The RNAs were eluted from the filters, treated with DNase (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's recommendations and store at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)**

RNA concentration and purity were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNAs were synthesized using the SuperScript III reverse Transcriptase (Life Technologies, Saint-Aubin, France) according to the manufacturer's recommendations. PCR was performed on 8ng RNA equivalent using a StepOnePlus Real-Time PCR Instrument (Life Technologies) with a FastSYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sense and anti-sense oligonucleotide primers used are detailed in (Table1). Internal controls were generated by amplifying the ribosomal protein S6 gene (RPS6) mRNA. All the samples were tested in duplicate and average values were used for quantification. The relative expression of the gene of interest was measured by the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method.

### **Western Blot**

Precipitated proteins were resuspended in 1:1 Protein solving buffer and tris(2-carboxyethyl) phosphine-reducing agent (PSB-TCEP, Macherey Nagel) and were then sonicated with Vibracell 75186 device (Sonics, Newton CT, USA). Protein concentration was determined and samples were incubated for 5 min at  $95^{\circ}\text{C}$  for complete protein dissolving and denaturation. Between 5 and 20  $\mu\text{g}$  of proteins were separated using the NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris gels (Life Technologies) with the 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid/sodium dodecyl sulfate running buffer (Life Technologies) or using the NuPAGE™ 3-8% Tris-Acetate gel (Life technologies) with the Tris-Acetate SDS Running Buffer (Life Technologies) before electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes (Life Technologies) with the iBlot™ Dry Blotting System (Life Technologies). After blocking in Tris-buffered Saline (TBS) with 0.1% (v/v) Tween-20 (Sigma) and 5% (w/v) non-fat dry milk for 30min at room temperature (RT), membranes were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with the same solution containing the primary antibodies detailed in Table 2. Bound antibodies were detected with HRP-conjugated anti-rabbit (Life technologies, diluted 1:5000) or anti mouse antibodies (Sigma, diluted 1:5000) diluted in TBS with 5% non-fat dry milk 1H and revealed by Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Revelation was visualized with laser-scanning densitometry ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

### **Histological score**

Mice colon were fixed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature (RT) for 3 h. To evaluate histological damage, a small fragment (0.5 cm) of the colon was placed in a tissue cassette and submerged in paraplast.

3  $\mu\text{m}$  of paraffin embedded cross sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin (H&E) using the appropriate procedures. Tissues were processed by the MicroPicell platform of “SFR santé François Bonamy – IRS UN” (Nantes, France)

H&E coloration allowed the visualization of tissues morphology. Tissue damage was scored by quantifying destruction of mucosal architecture, cellular infiltration and muscle thickening. The extent of destruction of normal mucosal architecture was scored as 0, 1, 2, 3 when the destruction was none, 1/3 basal, 2/3 basal and lead to loss of crypt and epithelium, respectively. The presence and degree of cellular infiltration was scored as 0, 1, 2, 3 when the infiltration was normal, around crypt basis, reaching the muscularis mucosae and in the submucosa, respectively. The extent of muscle thickening was scored as 0, 1, 2, 3 when the thickening was none, mild, moderate or massive, respectively. An extend score of 1, 2, 3 or for was applied when the criteria measured reached 25%, 50%, 75% or 100% of the fragment analyzed.

### Statistical analysis

Values are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Outliers were identified using the ROUT method of GraphPad Prism 7.0 with  $Q=1\%$  (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Group comparison was made using either the Mann-Whitney U test, Student test or the Kruskal-Wallis followed by a Dunn’s post hoc test. For exploratory tests, we considered two-tailed p values while we accepted one-tailed p values for hypothesis-driven tests. Differences were considered statistically significant for  $p<0.05$ .

**Table1:** Listing of primers used in this study.

Primers	Sens 5'-3'	Antisens 3'-5'
<b>Inflammatory genes</b>		
<b>mGCLC</b>	CCGACCAATGGAGGTGCAGTT	TCTCGTCAACCTTGGACAGCG
<b>mHO1</b>	CAACATTGAGCTGTTTGAGGAGC	TGTCTCTGCAGGGGAGTAT
<b>mIL-1<math>\beta</math></b>	GCCTCGTGCTGTCGGACCCATA	TTGAGGCCCAAGGCCACAGGT
<b>mNqo1</b>	AATGACATCACAGGTGAGCTGAA	GCAATGGAACTGAAATATCACCA
<b>mNrF2</b>	TAGATGACCATGAGTCGCTTGC	CGGTATTAAGACACTGTAATTCGGG
<b>mTLR2</b>	CCTCAGACAAAGCGTCAAATCT	ATCACACACCCAGAAGCAT
<b>mTLR4</b>	TCCCTGCATAGAGGTAGTTCC	TTGTTTCAATTTACACCTGGAT
<b>mTNF<math>\alpha</math></b>	GAACTTCGGGGTGATCGGTC	GCCACTCCAGTGCTCCTCC
<b>rIL-10</b>	TGCGACGCTGCATCGATTT	GTAGATGCCGGGTGGTTCAA
<b>rIL-1<math>\beta</math></b>	CAGCTTTCGACAGTGAGGAGA	TTGTCGAGATGCTGCTGTGA
<b>rIL-6</b>	TTGTTGACAGCCACTGCCTTCCC	TCTGACAGTGCATCATCGCTGTCA
<b>rTGF<math>\beta</math>1</b>	CAGACATTCGGGAAGCAGTGCCA	GGCGTATCAGTGGGGGTCAGC

<b>rTLR2</b>	CAGATGGCCACAGGACTCA	AATGGCCTTCCCTTGAGAG
<b>rTNF<math>\alpha</math></b>	GAGGAGAAGTCCCAATGGGCT	TTGGTGGTTTGCTACAGACGTG
<b>Tight Junction genes</b>		
<b>hmrOccludin</b>	GGATGACTTCAGGCAGCCTCG	CTGAAGTGATAGGTGGATATCCCTG
<b>hmrZO-1</b>	AAGAATATGGTCTTCGATTGGC	ATTTTCTGTACAGTACCATTATCTTC
<b>mCingulin</b>	AGCAGCAAGGAACCTCAGAAC	GTGTCTAACAAGTCCTTTAGGAGA
<b>mClaudin-1</b>	AATTCAGGTCTGGCGACAT	GGCCAAATTCATACCTGGCA
<b>mJAMA</b>	GCCGTGGATACCTTGAAGAACA	GTTTGAATCCCCCTCACTTCG
<b>Glial genes</b>		
<b>hmrGFAP</b>	CCTGGAACAGCAAAACAAGG	AGCCTCAGGTTGGTTTCATC-
<b>hmrS100<math>\beta</math></b>	GAGCTGGAGAAGGCCATGG	CTAATCTCACTCATGTTCAAGAAGCTC
<b>Neuronal genes</b>		
<b>mGAP43</b>	GGAGAAAGACGCTGTAGACGAA	AGAGACAGGGTTCAGGTGGG
<b>mHuD</b>	CGTGAGAGACAAAATCACAGGA	GGGCGTAGGACACCTTTATG
<b>mPGP9.5</b>	CCCCGAGATGCTGAACAAAGT	AGTTTTCATGCTGGGCCGT
<b>mPlexinA2</b>	GAATCCTTCTGTGCTGCTACT	TCTCATTCACTGACCTCCATAGA
<b>mSema5A</b>	CCACTTCCATCAACACGCA	ATTTCTGGTCGGACAGGTGG
<b>mSynapsin-1</b>	GGGATCACATTATTGAGGTGGTGG	TGAAGACTGGCTGTG0GGAGC
<b>mTub <math>\beta</math>III</b>	TAGACCCACAGCGCAACTAT	CAGCACCACTCTGACCAAAGATAA
<b>rBDNF</b>	GCGGCAGATAAAAAGACTGC	GCAGCCTTCTCTGTGTAAC
<b>rGAP43</b>	GAGAAAGAAGCTGTAGATGAAGCC	CAACGTGGAAAGCCGTTTCTT
<b>rGDNF</b>	CAGTGACTCCAATATGCCCGA	CTCTGCGACCTTCCCTCTG
<b>rHuD</b>	CATAAAGGTGTCGTACGCCG	CCACCCCTCTAGAGACTCTG
<b>rKalirin-7</b>	GATACCATATCCATTGCCTCCAGGACC	CCAGGCTGCGGCTAAACGTAAG
<b>rNRP1</b>	CAGCGATAAATGTGGCGGGA	GTCATACTTGCACTCTGTCTCTC
<b>rPGP9.5</b>	TGAAGCAGACCATCGGGAAC	GTCTTGGTTATTGGCCACTGC
<b>rPlexin A2</b>	GCAGGATCAATGTTTCAGAGGACTG	GGTACGAGCTGTTTGGCACT
<b>rSema5A</b>	AGGGCAAATCGAAGGAGGAA	AAGGAGCGGATGGTACAGAC
<b>rSynapsin-1</b>	AGTTGTGAGGTCTCTGAAGCCA	GAACCATCTGGGCAAAACCCC
<b>rTub <math>\beta</math>III</b>	GATAGGGGCCAAGTTCTGGGA	CTGGGCACATACTTGTGAGAGGA
<b>Housekeeping genes</b>		
<b>rRPS6</b>	GCATTGTGGATGCCAACCTG	GTCCTGGGCTTCTTACCTTCTT
<b>mRPS6</b>	GAAGCGCAAGTCTGTTCGTG	GTCCTGGGCTTCTTACCTTCT



**Table2:** Listing of antibodies used in this study:

<b>Protein</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>	<b>Reference</b>
<b>Tight junction</b>			
<b>Occludin</b>	Rabbit	1 :500	Ab31721, Abcam
<b>Claudin-1</b>	Rabbit	1 :200	51-90000, In Vitrogen
<b>ZO-1</b>	Mouse	1:200	33-9100, In Vitrogen
<b>ZO-2</b>	Rabbit	1:500	#2847, Cell Signaling
<b>JAMA</b>	Rabbit	1 :500	A302-891A, Bethyl Laboratories
<b>Cingulin</b>	Rabbit	1 :200	Sc66831, SantaCruz
<b>Glial</b>			
<b>S100<math>\beta</math></b>	Rabbit	1:500	AMAb91038, Atlas Antibodies
<b>GFAP</b>	Rabbit	1:2000	20334, Dako
<b>Neuronal</b>			
<b>Tub <math>\beta</math>III</b>	Rabbit	1:1000	Ab52623, Abcam
<b>PGP9.5</b>	Mouse	1:400	MA1-83428, Life Technologies
<b>Synapsin-1</b>	Rabbit	1:1000	#5297, Cell Signaling
<b>GAP43</b>	Mouse	1:500	NBP-250052, Novus Biotechnologies
<b>P-GAP43</b>	Rabbit	1:1000	NBP-300-179, Novus Biotechnologies
<b>Sema5A</b>	Sheep	1:100	AF5896, R&D System
<b>Loading Control</b>			
<b><math>\beta</math>-Actine</b>	Mouse	1:5000	A5441, Sigma
<b><math>\beta</math>-Actine</b>	Rabbit	1:2000	Ab189073, Abcam

## Results

### Transfer of FS-ASD in mice induces changes in colonic permeability

To determine whether microbiota-derived mediators could induce GI dysfunctions relevant to ASD GI symptoms, transfer of FS-HC and FS-ASD were performed by enemas in antibiotics-treated mice to analyze intestinal motility and permeability. The colonic propulsive motor function, assessed by FPO measurements, was similar between mice treated with FS-ASD or FS-HC (Fig. 1A). However, the wet pellet weight was significantly reduced in mice treated with FS-ASD compared to mice treated with FS-HC (Fig. 1B). However, the fecal water content was similar between the two groups (Fig. 1C). The intestinal transit rate, evaluated by the distance of migration of carmin red previously administrated by gavage, indicated similar values in mice treated with either FS-HC or FS-ASD (Fig. 1D).

The *in vivo* intestinal permeability was assessed for small (FSA) and large (HRP) molecules. No difference in the seric concentration of FSA or HRP was detected between mice treated with FS-HC and FS-ASD (Fig. 2A). Because the *in vivo* intestinal permeability was measured 2h after gavage with FSA and HRP, it is possible that our measurements mostly reflect the permeability of the upper part of the gastrointestinal tract while sparing the most distal part, i.e. the colon. Moreover, given that the FS were administrated by rectal enema, we anticipated that this treatment would mostly affect the colon, corresponding to the closest region from the site of application. We therefore examined the *ex vivo* permeability of the proximal and distal colon for FSA and HRP. In the proximal colon of mice treated with FS-ASD, the permeability to FSA and HRP were significantly reduced as compared to mice treated with FS-HC (Fig. 2B). In the distal colon, no change of the permeability to FSA or HRP was noted between the two groups (not shown). We next aimed to determine whether these functional changes were associated with alterations in morphological parameters of the intestinal epithelial barrier. The thickness of the gut wall, the mucosa integrity index and infiltration index were all similar between the FS-ASD and FS-HC groups (Fig. 2C).

### Transfer of FS-ASD in mice modulates inflammation-related gene expression in the gut and epithelial barrier integrity.

Several studies have reported that changes in intestinal permeability are associated with modifications of gut inflammatory profile (ref). We then examined whether FS transfer modulated the gene expression of key molecules involved in inflammatory processes (see S1). As shown in Fig. 3A, decreased gene expression of the pro-inflammatory cytokines IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  were observed in the colon of FS-ASD-treated mice as compared to controls. We also examined the expression level of molecules involved in protective mechanisms in response to inflammation and oxidative stress. In mice treated with FS-ASD, as compared to FS-HC, increased colonic expression of heme oxygenase-1 (HO-1) was observed while no difference was found between the two groups regarding the expression of glutamate cysteine ligase, catalytic subunit (GCLC), a rate-limiting enzyme in glutathione biosynthesis (Fig. 3A). Expression of several key

components of tight junctions formed between epithelial cells was studied as an index to evaluate the intestinal epithelial barrier integrity in the proximal colon. No different mRNA and protein expression level was observed for occludin, ZO-1, JAMA and claudin-1 while cingulin showed a decreased expression in FS-ASD compared to HC mice (Fig. 4E and suppl data 3 or 2). A similar pattern of regulation was obtained at the protein level, except for JAMA for which a marked decrease was induced by FS-ASD compared to FS-HC (Fig. 4E). These results indicated that intestinal barrier function and expression of central molecules for tight junction structure were specifically regulated by FS-ASD as compared to FS-HC.

### **FS-ASD modulated expression of neuronal and glial molecules**

The impact of FS-ASD on the ENS was assessed by studying the mRNA and protein expression of glial and neuronal molecules in proximal colon (See S1 and S2). Regarding the expression of the glial molecule S100 $\beta$ , FS-ASD induced a 2.5 times increase of mRNA without affecting the amount of the corresponding protein (Fig. 5A), while the opposite effect was observed for GFAP with no change at the mRNA level but a decreased at the protein level for the 52 kDa molecular form (Fig.5B). The expression analyses of the neuronal molecules,  $\beta$ III-tubulin, a major component of the neuronal microtubule network, and synapsin 1, a presynaptic protein associated with synaptic vesicles in axon terminals, indicated for both molecules an increased in gene expression, but a decreased in protein expression in mice treated with FS-ASD as compared to FS-HC (Fig. 5C). In addition, we studied the mRNA level of growth-associated protein-43 (GAP43), a molecule important for neuronal plasticity and shown to be overexpressed in ASD individuals (Zikopoulos & Barbas, 2010). The gene expression of GAP43 was higher in FS-ASD mice compared to FS-HC mice but no change was observed for phosphorylated GAP43 at Ser41, an activated form of GAP43 (Fig. 5D). These results indicated that the expression of critical molecules for ENS functions, in particular for neuronal functions, was specifically regulated by FS-ASD as compared to FS-HC.

### **FS can exert a direct effect on the ENS by modulating expression of glial and neuronal molecules**

The regulation of glial and neuronal molecules induced by FS-ASD in colon mice suggested that ENS cells could be direct targets of FS. To test this hypothesis, ENS cultures were treated with FS-HC and FS-ASD to examine whether the expression of cell type-specific molecules of enteric glia and neurons were regulated by FS. As for *in vivo* data, we found that FS-ASD induced an increase of S100 $\beta$  and no change of GFAP mRNA levels (Fig. 6A and not shown). However, in contrast to *in vivo* conditions, GFAP protein expression was not modified between FS-HC and FS-ASD groups. Gene and protein expression of  $\beta$ III-tubulin were both increased by FS-ASD, as compared to FS-HC (Fig. 6B). Regarding synapsin1, the gene expression was similar in ENS cultures treated with FS-HC and FS-ASD but showed an increase in protein expression in FS-ASD condition (Fig. 6B). The gene expression of GAP43 was higher in ENS cultures treated with

FS-ASD than with FS-HC but no difference of phospho-GAP43 protein expression was found between the two groups (Fig.6B).

### **Changes in the concentration of bacterial-derived mediators in FS-ASD**

The fecal concentration of several bacterial-derived mediators was measured in control and ASD individuals. The concentration of total short chain fatty acids (SCFA), as key bacterial fermentation products, was not different between the two groups (Table 3), either for total, major (acetate, butyrate, propionate) or minor (isobutyrate, valerate) SCFA. We also examined the fecal concentration of total, primary and secondary bile acids. Primary bile acids are synthesized from cholesterol in the liver, conjugated with glycine or taurine, secreted into the gallbladder, and transported to the intestine to be metabolized into secondary bile acids by gut bacteria. The fecal concentration of total bile acids was increased in ASD as compared to HC groups ( $p=0.011$ ; Table 3). Examination of the primary and secondary bile acids revealed that there was a twice more elevated concentration of the secondary bile acid deoxycholic acid in ASD compared to HC groups ( $p=0.0xx$ ) while no significant changes were observed for the primary bile acids cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) or for the other secondary bile acids lithocholic acid (LCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA). Finally, the measurement of fecal concentration of the endotoxins lipopolysaccharides, which are biologically active compounds derived from the outer cell membrane of gram-negative bacteria, indicated no change between the two groups. Next, we analyzed whether some of the aforementioned bacterial-derived mediators could be differentially represented in ASD GI+ and ASD GI- subgroups. We found that the SCFA valerate was the sole compound which showed a different fecal concentration between the two groups, with a reduced level of valerate in ASD GI+ compared to ASD GI- (Table 3).

### **The bacterial metabolite DCA induces a molecular remodeling of the gut distinct from that induced by FS treatment**

Our results showing a higher concentration of the secondary bile acid DCA prompted us to test the hypothesis that this bacterial-derived mediator could trigger some of the specific effects induced by FS-ASD. Mice received DCA 5 mM by enema and were analyzed 3 days later for permeability and colonic expression of inflammatory, glial and neuronal molecules. No change of *in vivo* permeability (not shown) and *ex vivo* colonic permeability was observed after DCA treatment although a trend towards an increased permeability of SFA and HRP was shown in the proximal colon of DCA-treated mice compared to control mice (Fig. 6A). The gene expression of inflammation-related molecules HO-1 (Fig. 6B), TNF $\alpha$  and IL1- $\beta$  and that of glial molecules S100 $\beta$  and GFAP were not modified between control and DCA-treated mice (not shown). The neuronal molecules Tuj1, synapsin 1 and GAP43 all showed an increased gene expression in DCA-treated mice compared to control mice but their protein expression was not modified between the two groups (Fig. 6C,D,E).

## Discussion

Our study showed that FS-ASD transferred into mice induced several functional and molecular modifications in the gastrointestinal tract as compared to mice treated with FS-HC. First, we found that FS-ASD reduced intestinal barrier permeability and directed the gut molecular profile towards a protective and anti-inflammatory pattern. Second, FS-ASD treatment induced changes in the expression of several molecules involved in neuronal connectivity and repair suggesting that FS-containing factors regulate ENS neuronal network and that this effect might result from direct action on ENS cells. Finally, we showed that a bacterial-derived metabolite, the secondary bile acid DCA, was overrepresented in FS-ASD as compared to FS-HC. When administrated to mice, DCA modulated the expression of the same set of neuronal molecules targeted by FS transfer, although in the opposite way. Altogether our data indicated that FS-ASD induced specific gut functional and molecular remodeling, and that the implicated factors include molecules other than DCA.

One major finding of this study is the modification of the intestinal epithelial barrier integrity induced by FS-ASD relative to FS-HC. We found that FS-ASD application in mice reduced the permeability for both small and large molecules in colonic segments. These results are different from previous studies conducted in genetic or maternal immune activation animal models of ASD which showed an increased intestinal permeability compared to control animals (Hsiao *et al.*, 2013; Golubeva *et al.*, 2017). Our results are also apparently conflicting with the reported increased intestinal permeability reported in a subset of ASD individuals (D'Eufemia *et al.*, 1996; de Magistris *et al.*, 2010; Kushak *et al.*, 2016). This difference could be due to the temporal context of the analyses. Indeed, the studies cited above all reflect a context of chronic long-term physiopathological impairment, with genetic deficit in KO mice, a long-term impact of maternal immune activation on the offspring and the long-lasting condition of ASD. In our study, the context is on the contrary on a short-term scale of a 3-days treatment of mice with FS, which could correspond to the restoration phase of the epithelial barrier shown to take place shortly after an acute injury. For instance, it has been shown that ischemia or exposition to noxious luminal contents such as bile induce a succession of complex events leading to reparative mechanisms for epithelial barrier wounds closure and functional recovery (Blikslager *et al.*, 2007). FS-ASD treatment for 3 days could be considered as an acute injury, which might trigger epithelial barrier repair processes resulting in the reinforcement of its structure and in turn in the decrease of the intestinal barrier permeability. Whether long-term treatment with FS-ASD would eventually result in the opposite effect, i.e. increased intestinal barrier permeability remains to be determined. Analyses of the expression of several inflammatory-related molecules indicated that the application of FS-ASD increased the colonic expression of the antioxidant and anti-inflammatory molecule HO-1 but decreased the expression of the proinflammatory molecules IL1b and TNFa as compared to mice treated with FS-HC. The contribution of HO-1-dependant pathways in the reduction of deleterious inflammatory processes has been widely demonstrated in intestinal inflammation including colitis and inflammatory bowel disease (IBD) (Hegazi *et al.*, 2005; Sebastian *et al.*, 2018) while IL1-b and TNFa have been shown to mediate intestinal inflammation involved in IBD in both animal models and human (Shouval *et al.*, 2016; Ruder *et al.*, 2019).

Together with the reduced intestinal permeability, our results suggest that short-term treatment with FS-ASD induces in the gut a protective and anti-inflammatory profile. Although no modification of morphological parameters was found in the intestinal barrier between mice treated with FS-ASD and FS-HC, downregulation of the tight junction-associated proteins cingulin and JAM-A was observed in the colon of mice treated with FS-ASD compared to FS-HC. Whether the decreased protein expression of cingulin and JAM-A contribute to the reduced intestinal permeability observed in FS-ASD-treated mice is currently unknown but previous studies reported that decreased level of cingulin affected the expression of another critical tight junction-associated protein, claudin-2 (Guillemot *et al.*, 2012) and that phosphorylation level of cingulin regulated its binding properties to actin filaments vs. microtubules contributing thereby to modulation of barrier functions of epithelial cell sheets (Yano *et al.*, 2018).

Another important finding of this study is the FS-ASD-induced modulation of gene and protein expression of ENS molecules related to neuronal connectivity and plasticity. These data are consistent with the structural remodeling of ENS previously shown in different genetic animal models of autism. These studies indicated that transgenic expression of a mutant form of neuroligin3 in mouse resulted in increased number of myenteric neurons in the small intestine (Hosie) while disruption of CHD8 expression in zebrafish induced a decreased number of enteric neurons (Bernier). In the BTBR mice, a decreased number of neurons was noted along with an increase of the interganglionic space (Golubeva). In the present study we found that the neuronal molecules regulated by FS-ASD,  $\beta$ III-tubulin, synapsin 1 and GAP43, belong to a class of molecules involved in neuronal structure network and plasticity. The FS-ASD-induced changes in the expression of  $\beta$ III-tubulin, synapsin 1 and GAP43 were observed at the mRNA and protein level, albeit in opposite ways. This opposite regulation of gene and protein expression has already been observed for other molecules, such as for the glial molecule S100 $\beta$ , and reflects the complexity of the regulatory mechanisms that are selectively exerted at the level of gene and protein expression (Liu *et al.*, 2015). Interestingly, we observed that increased expression of  $\beta$ III-tubulin and GAP43 mRNAs, but however not that of synapsin 1, were replicated in a primary culture model of ENS treated with FS-ASD, suggesting that compounds present in FS could directly act on ENS cells. However, the FS-ASD-induced regulations at the protein level for  $\beta$ III-tubulin and synapsin 1 are opposite between the *in vivo* and *in vitro* situation suggesting that ENS culture conditions did not completely reproduce the *in vivo* situation and that the cellular environment is critical in FS-induced regulation of protein expression. In any case, our results indicated that compared to FS-HC, FS-ASD selectively induced a remodeling of the expression of key molecules for neuronal circuitry and connectivity. This result suggests that FS-ASD might induce changes in the structure of the ENS, which could have major impact on ENS function and thereby on digestive symptoms. Indeed, it has been shown that anomalies in the ENS axonal harbor configuration could result in severe bowel dysmotility (Sasseli) and that the complexity of neuronal connectivity correlated with intestinal motility pattern (Li). The changes induced by FS-ASD on the expression of molecules related to ENS neuronal connectivity are of particular interest given that anomalies in brain neuronal connectivity have been consistently reported to be associated with ASD. Post-mortem analysis of brain from ASD individuals showed structural changes in neuronal networks associated with an increased synapse density (Zikopoulos &

Barbas, 2013). In addition, functional magnetic resonance imaging revealed functional alterations of the neuronal connectivity, either hypo- or hyperconnectivity of ASD individuals depending on the brain region(Holiga *et al.*, 2019). Human and mouse in vitro models of ASD mimicked these synaptic connectivity abnormalities associated with spontaneous hyperactivity of brain neurons(Huang *et al.*, 2016; Deneault *et al.*, 2019). Our present results showing a decreased protein level of  $\beta$ III-tubulin and synapsin 1 in the colon of mice treated with FS-ASD compared to FS-HC suggest that defects in synaptic connectivity in between neurons or with gut target cells might occur in the ENS in parallel to those already documented in the brain of ASD individuals.

Altogether, our results suggest that compounds present in FS would be able to induce the functional effects observed on intestinal permeability and on the regulation of ENS molecules expression. We hypothesized that bacterial metabolites or components present in FS could mediate these effects. Measurements of the FS concentration of SCFA, bile acids, and endotoxins revealed a higher concentration of the secondary bile acid DCA, a product resulting from primary bile acids metabolism of the intestinal microbiota, in the FS-ASD compared to FS-HC. To our knowledge, this is the first study reporting an elevated concentration of secondary bile acids in fecal sample from ASD individuals but previous studies in the BTBR mice model of ASD described altered fecal concentration of secondary bile acids(Golubeva *et al.*, 2017). Previous studies in rodents have shown that DCA affects the permeability of the intestinal epithelial barrier through a neurally-mediated mechanism involving the ENS(Sun *et al.*, 2004; Forsgard *et al.*, 2014). In addition, binding of DCA to the bile acid receptor TGR5 caused a slowdown of intestinal transit and stomach emptying(Alemi *et al.*, 2013). Interestingly, enteric neurons have been shown to express TGR5 receptors, suggesting that DCA might control gastrointestinal functions through the modulation of enteric neuron activity(Duboc *et al.*, 2016). Given the elevated concentration of DCA in fecal samples of ASD individuals, we examined whether DCA administrated in mice could mimic some of the effects induced by FS-ASD. Among the parameters studied, only the gene expression of Tuj1, synapsin 1 and GAP43 showed a significant difference between DCA-treated and control mice. However, we observed a decrease in the expression of these molecules in DCA-treated mice, which was opposite to the effects induced by FS-ASD. These results suggest that DCA induced a remodeling of the expression of neuronal molecules, but that the effects induced by FS-ASD resulted from a more complex set of factors than the presence of DCA alone.

Figure Legends

	HC	ASD	Mann-Whitney p values	ASD GI+	ASD GI-	Mann-Whitney p values
<b>SCFA (mM)</b>						
Acetate	6.57 ± 0.61	7.36 ± 0.47	0.178	6.67 ± 0.61	7.77 ± 0.64	p = 0.220
Propionate	2.35 ± 0.28	2.57 ± 0.19	0.247	2.24 ± 0.21	2.95 ± 0.32	p = 0.066
Butyrate	1.98 ± 0.19	2.61 ± 0.25	0.138	2.32 ± 1.50	2.88 ± 1.59	p = 0.297
Isobutyrate	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.357	0.26 ± 0.15	0.37 ± 0.19	p = 0.073
Valerate	0.26 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.344	0.26 ± 0.03	0.35 ± 0.03	<b>p = 0.043</b>
<b>Bile acids (µg/mL)</b>						
Primary						
CDCA	0.045 ± 0.011	0.049 ± 0.006	0.373	0.036 ± 0.005	0.067 ± 0.013	p = 0.117
CA	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.246	0.010 ± 0.002	0.004 ± 0.001	p = 0.097
Secondary						
DCA	14.83 ± 4.24	26.87 ± 3.57	<b>0.028</b>	21.59 ± 3.84	34.53 ± 7.079	p = 0.244
LCA	0.71 ± 0.16	0.536 ± 0.074	0.233	0.696 ± 0.149	0.457 ± 0.072	p = 0.515
UDCA	0.03 ± 0.01	0.042 ± 0.009	0.235	0.041 ± 0.008	0.029 ± 0.009	p = 0.319
<b>Endotoxins (EU/mL)</b>						
Total	13089 ± 1285	11630 ± 949	0.242	11348 ± 1446	11767 ± 1321	p = 0.900

**Table 3.** Concentration of short chain fatty acids, bile acids and endotoxins in the fecal supernatant of ASD individuals and control subjects. Values represent means ± SEM (n=10-12). Statistical analyses were performed with the Mann-Whitney test.



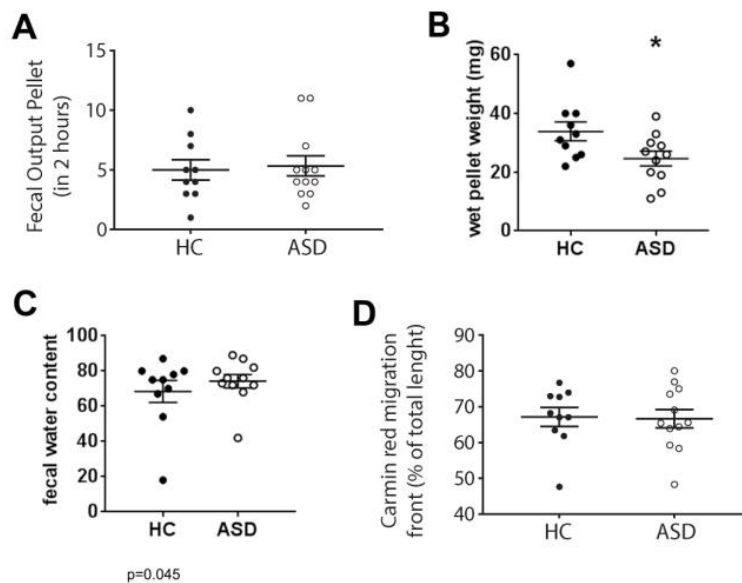


Fig. 1

**Figure 1. Mice treated FS-ASD show similar intestinal motility but an increased pellet weight than mice treated with FS-HC.** (A) *In vivo* colonic propulsive motor function assessed by the measure of the FPO for 1h. (B) Wet pellet weight and –C) fecal water content. (D) Intestinal transit rate measured as the distance of migration of carmin red. All data represent means  $\pm$  SEM (n=10-11). \* $p < 0.05$ , Mann-Whitney test.

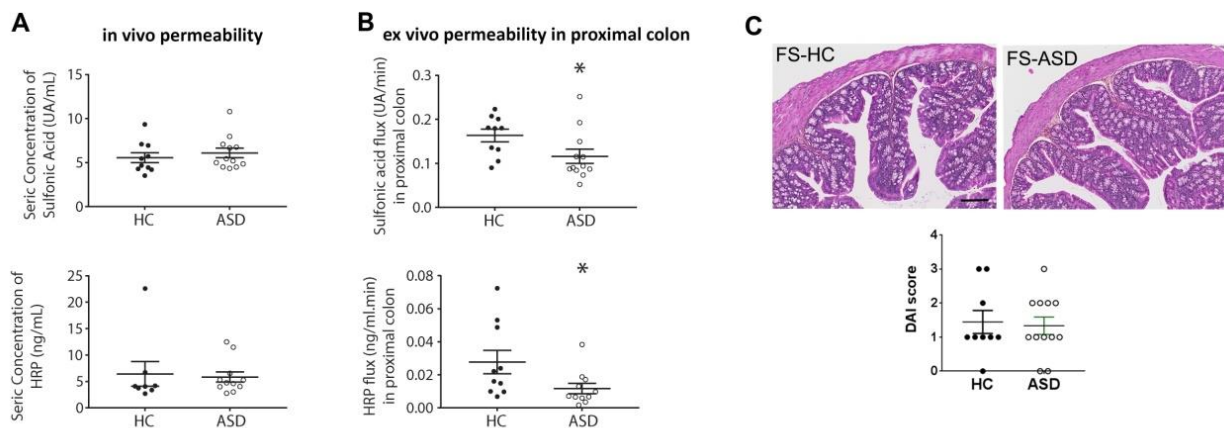
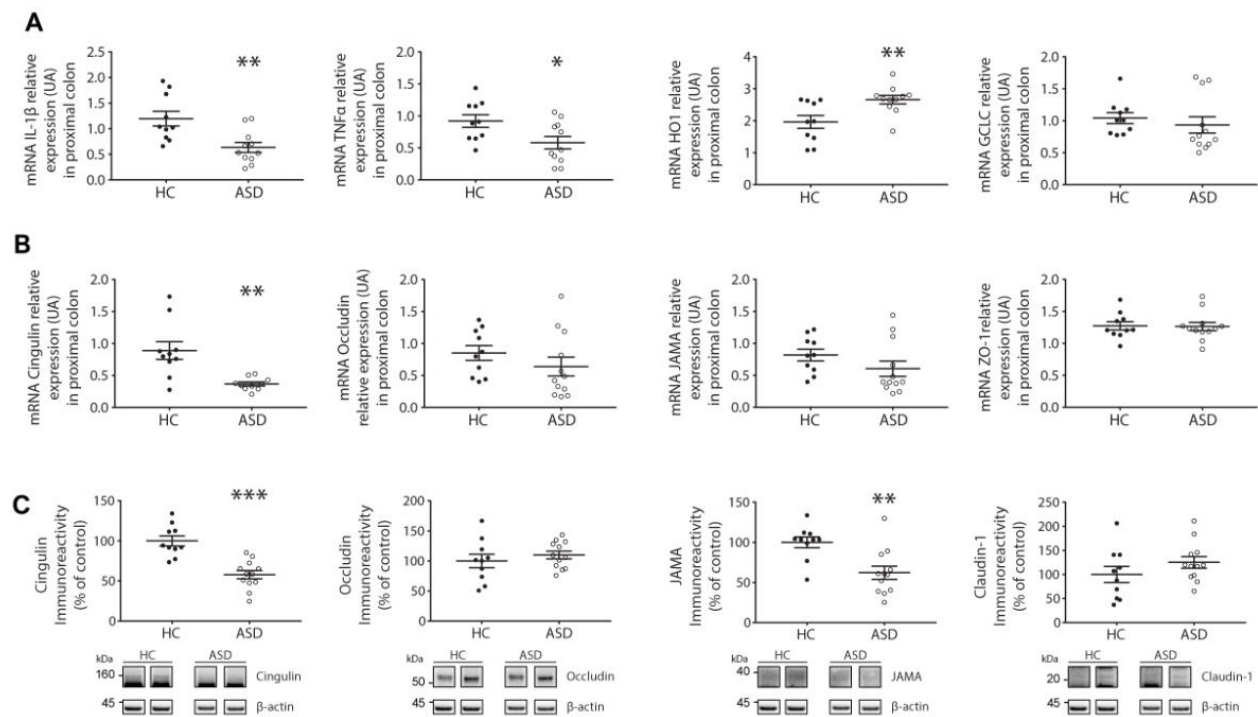


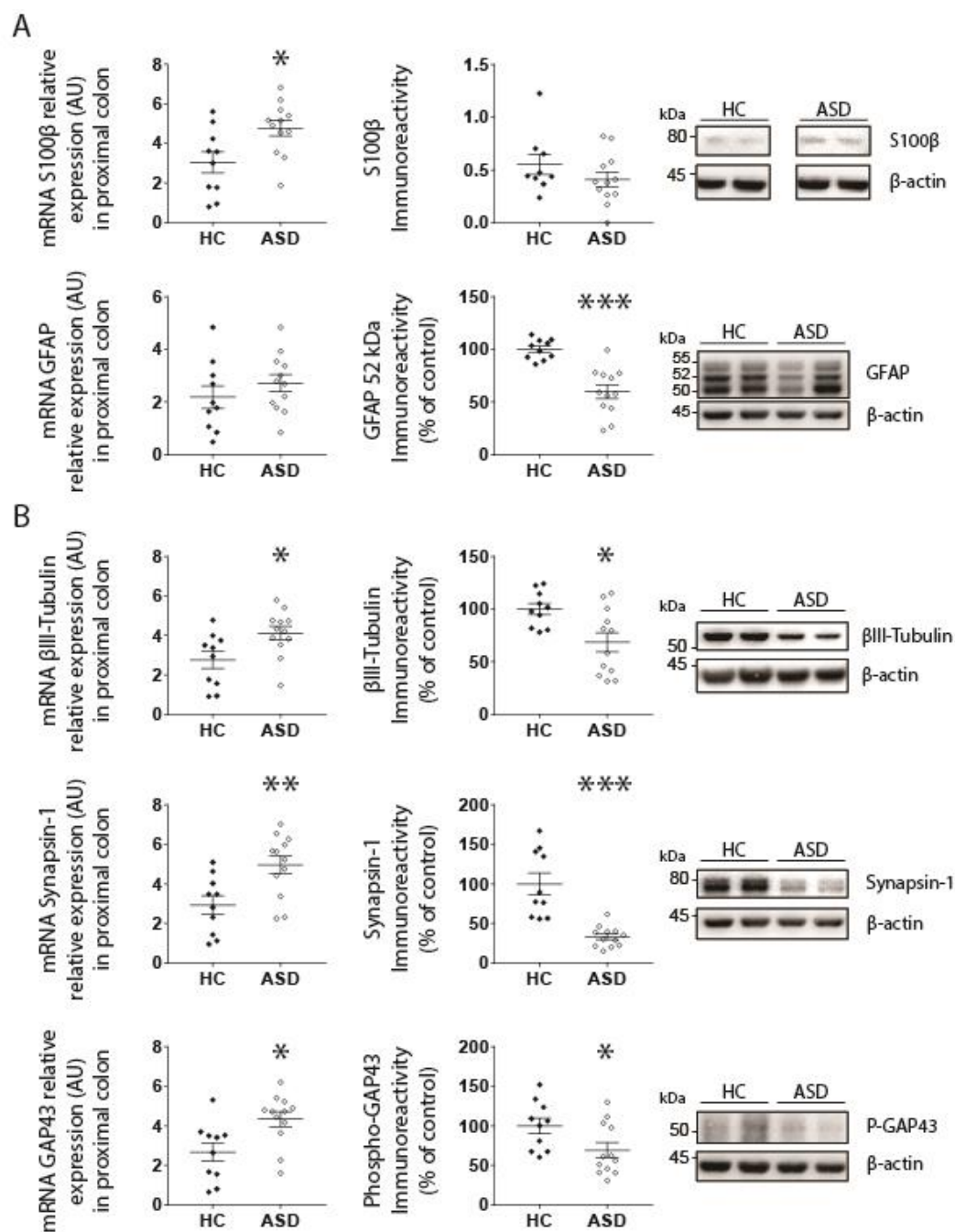
Fig. 2

**Figure 2. Mice treated with FS-ASD exhibit reduced colonic permeability.** *In vivo* (A) and *ex vivo* (B) permeability for FSA and HRP in proximal colon segments determined in Ussing chambers by measurements of mucosal to serosal flux of the markers. Data are expressed in arbitrary units (AU) and represent means  $\pm$  SEM (n=10-12), \* $p < 0.05$ , Mann-Whitney test. (C) Morphological parameters of the intestinal epithelial barrier characterized by a histological score integrating quantification of the thickness of the gut wall, the mucosa integrity and cellular infiltration.

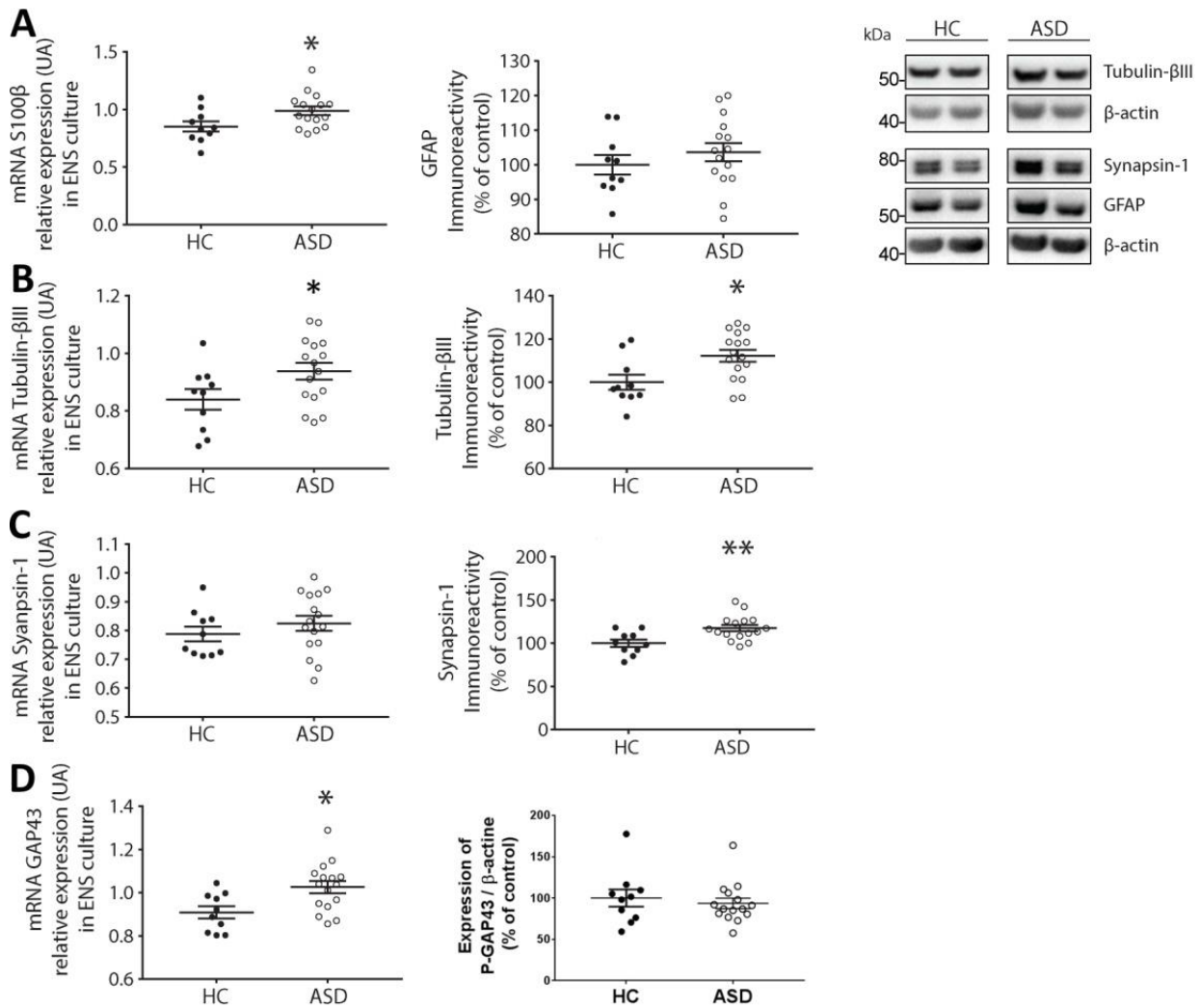


**Fig. 3**

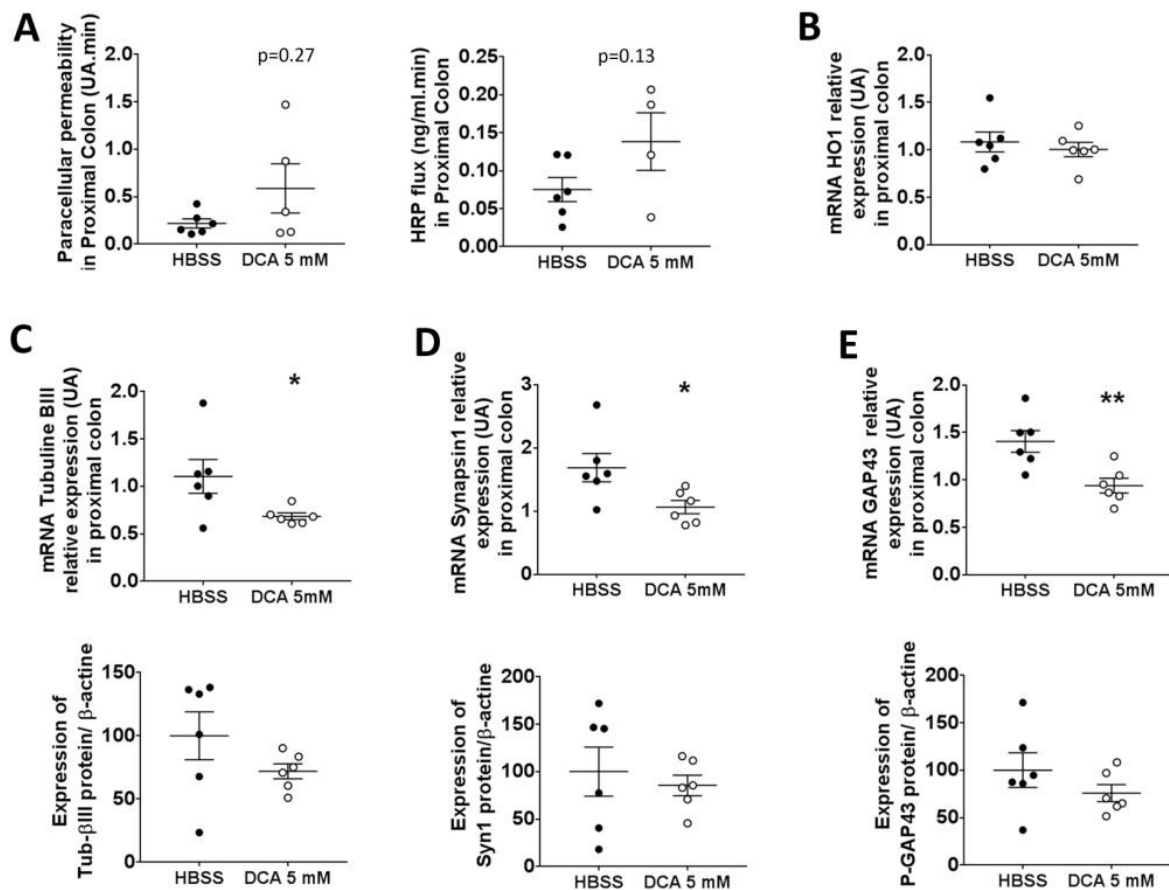
**Figure 3. Transfer of FS-ASD in mice modulates the expression of inflammation-related molecules and tight junction components.** (A) Gene expression of molecules with proinflammatory (IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ) and anti-oxydative (HO-1 and GCLC) activity in the proximal colon of mice treated with FS-HC or FS-ASD. (B) Gene expression of tight junction-forming molecules measured by qPCR in the proximal colon of mice treated with FS-HC or FS-ASD. Data are expressed in arbitrary units (AU) and represent means  $\pm$  SEM (n=10-12), \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mann-Whitney test. (C) Protein expression of tight junction-forming molecules measured by Western blot in the proximal colon of mice treated with FS-HC or FS-ASD. For each protein, quantification of the signal intensity was normalized to  $\beta$ -actin signal in the same sample and expressed as a percentage of controls. All values represent means  $\pm$  SEM (n=10-12), \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mann-Whitney test.



**Figure 4. Transfer of FS-ASD in mice modulates the expression of glial and neuronal molecules.** (A) Gene and protein expression of the glial molecules S100 $\beta$  and GFAP determined in the proximal colon of mice treated with FS-HC or FS-ASD by qPCR and Western blot respectively. (B) Gene and protein expression of the neuronal molecules  $\beta$ III-tubulin, synapsin 1 and GAP43 determined in the proximal colon of mice treated with FS-HC or FS-ASD by qPCR and Western blot respectively. All values represent means  $\pm$  SEM (n=10-12), \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001Mann-Whitney test.



**Figure 5. FS-ASD applied to ENS primary cultures induces a remodeling of glial and neuronal molecule expression.** (A) Quantification of the mRNA expression of S100β and of the protein expression of GFAP in ENS cultures treated with FS-HC or FS-ASD. Quantification of the mRNA and protein expression level for βIII-tubulin, synapsin 1 and GAP43 in ENS cultures treated with FS-HC or FS-ASD. All values represent means ± SEM (n=10-12), \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mann-Whitney test.



**Fig. 6**

**Figure 6. Mice treated with the bacterial metabolite DCA show a molecular remodeling in the proximal colon distinct from that induced by FS treatment.** (A) Ex vivo permeability for FSA and HRP in determined in proximal colon segments of mice treated with vehicle or 5 mM DCA. (B) mRNA expression of HO-1 measured by qPCR of the proximal colon of mice treated with vehicle or DCA. (C-E) Quantification of the mRNA and protein expression for  $\beta$ III-tubulin, synapsin 1 and GAP43 in ENS cultures treated with vehicle or 5mM DCA. All values represent means  $\pm$  SEM (n=10-12), \*p<0.05, Mann-Whitney test.

## References

- Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D & Rubin RA. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology* **11**, 22.
- Alemi F, Poole DP, Chiu J, Schoonjans K, Cattaruzza F, Grider JR, Bunnett NW & Corvera CU. (2013). The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice. *Gastroenterology* **144**, 145-154.
- Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O, Witherspoon K, Gerdtts J, Baker C, Vulto-van Silfhout AT, Schuurs-Hoeijmakers JH, Fichera M, Bosco P, Buono S, Alberti A, Failla P, Peeters H, Steyaert J, Vissers L, Francescatto L, Mefford HC, Rosenfeld JA, Bakken T, O'Roak BJ, Pawlus M, Moon R, Shendure J, Amaral DG, Lein E, Rankin J, Romano C, de Vries BBA, Katsanis N & Eichler EE. (2014). Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* **158**, 263-276.
- Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL & Odle J. (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiological reviews* **87**, 545-564.
- Borre YE, O'Keefe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG & Cryan JF. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in molecular medicine*.
- Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF & Costa-Mattioli M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell* **165**, 1762-1775.
- Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ, 3rd, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, Whitaker AH, Atkins D, Bauman ML, Beaudet AL, Carr EG, Gershon MD, Hyman SL, Jirapinyo P, Jyonouchi H, Kooros K, Kushak R, Levitt P, Levy SE, Lewis JD, Murray KF, Natowicz MR, Sabra A, Wershil BK, Weston SC, Zeltzer L & Winter H. (2010). Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics* **125 Suppl 1**, S1-18.
- Colvert E, Tick B, McEwen F, Stewart C, Curran SR, Woodhouse E, Gillan N, Hallett V, Lietz S, Garnett T, Ronald A, Plomin R, Rijdsdijk F, Happe F & Bolton P. (2015). Heritability of Autism Spectrum Disorder in a UK Population-Based Twin Sample. *JAMA psychiatry* **72**, 415-423.
- d'Albis MA, Guevara P, Guevara M, Laidi C, Boisgontier J, Sarrazin S, Duclap D, Delorme R, Bolognani F, Czech C, Bouquet C, Ly-Le Moal M, Holiga S, Amestoy A, Scheid I, Gaman A, Leboyer M, Poupon C, Mangin JF & Houenou J. (2018). Local structural connectivity is associated with social cognition in autism spectrum disorder. *Brain : a journal of neurology* **141**, 3472-3481.
- D'Eufemia P, Celli M, Finocchiaro R, Pacifico L, Viozzi L, Zaccagnini M, Cardi E & Giardini O. (1996). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta paediatrica* **85**, 1076-1079.
- Dabek M, Ferrier L, Annahazi A, Bezirard V, Polizzi A, Cartier C, Leveque M, Roka R, Wittmann T, Theodorou V & Bueno L. (2011). Intracolonic infusion of fecal supernatants from ulcerative colitis individuals triggers altered permeability and inflammation in mice: role of cathepsin G and protease-activated receptor-4. *Inflammatory bowel diseases* **17**, 1409-1414.
- Dalton N, Chandler S, Turner C, Charman T, Pickles A, Loucas T, Simonoff E, Sullivan P & Baird G. (2014). Gut permeability in autism spectrum disorders. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* **7**, 305-313.

- de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Frolli A, Iardino P, Carteni M, De Rosa M, Francavilla R, Riegler G, Militerni R & Bravaccio C. (2010). Alterations of the intestinal barrier in individuals with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**, 418-424.
- De Palma G, Lynch MD, Lu J, Dang VT, Deng Y, Jury J, Umeh G, Miranda PM, Pigrau Pastor M, Sidani S, Pinto-Sanchez MI, Philip V, McLean PG, Hagelsieb MG, Surette MG, Bergonzelli GE, Verdu EF, Britz-McKibbin P, Neufeld JD, Collins SM & Bercik P. (2017). Transplantation of fecal microbiota from individuals with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Science translational medicine* **9**.
- Deneault E, Faheem M, White SH, Rodrigues DC, Sun S, Wei W, Piekna A, Thompson T, Howe JL, Chalil L, Kwan V, Walker S, Pasceri P, Roth FP, Yuen RK, Singh KK, Ellis J & Scherer SW. (2019). CNTN5(-)/(+)- or EHMT2(-)/(+)-human iPSC-derived neurons from individuals with autism develop hyperactive neuronal networks. *eLife* **8**.
- Dothel G, Barbaro MR, Boudin H, Vasina V, Cremon C, Gargano L, Bellacosa L, De Giorgio R, Le Berre-Scoull C, Aubert P, Neunlist M, De Ponti F, Stanghellini V & Barbara G. (2015). Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of individuals with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **148**, 1002-1011 e1004.
- Duboc H, Tolstanova G, Yuan PQ, Wu V, Kaji I, Biraud M, Akiba Y, Kaunitz J, Million M, Tache Y & Larauche M. (2016). Reduction of epithelial secretion in male rat distal colonic mucosa by bile acid receptor TGR5 agonist, INT-777: role of submucosal neurons. *Neurogastroenterol Motil* **28**, 1663-1676.
- Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR & Green JA, 3rd. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* **16**, 444-453.
- Fiorentino M, Sapone A, Senger S, Camhi SS, Kadzielski SM, Buie TM, Kelly DL, Cascella N & Fasano A. (2016). Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Molecular autism* **7**, 49.
- Forsgard RA, Korpela R, Stenman LK, Osterlund P & Holma R. (2014). Deoxycholic acid induced changes in electrophysiological parameters and macromolecular permeability in murine small intestine with and without functional enteric nervous system plexuses. *Neurogastroenterol Motil* **26**, 1179-1187.
- Gillberg C & Billstedt E. (2000). Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders. *Acta psychiatrica Scandinavica* **102**, 321-330.
- Golubeva AV, Joyce SA, Moloney G, Burokas A, Sherwin E, Arboleya S, Flynn I, Khochanskiy D, Moya-Perez A, Peterson V, Rea K, Murphy K, Makarova O, Buravkov S, Hyland NP, Stanton C, Clarke G, Gahan CGM, Dinan TG & Cryan JF. (2017). Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism. *EBioMedicine* **24**, 166-178.
- Gondalia SV, Palombo EA, Knowles SR, Cox SB, Meyer D & Austin DW. (2012). Molecular characterisation of gastrointestinal microbiota of children with autism (with and without gastrointestinal dysfunction) and their neurotypical siblings. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* **5**, 419-427.

- Grimaldi R, Gibson GR, Vulevic J, Giallourou N, Castro-Mejia JL, Hansen LH, Leigh Gibson E, Nielsen DS & Costabile A. (2018). A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome* **6**, 133.
- Guillemot L, Schneider Y, Brun P, Castagliuolo I, Pizzuti D, Martines D, Jond L, Bongiovanni M & Citi S. (2012). Cingulin is dispensable for epithelial barrier function and tight junction structure, and plays a role in the control of claudin-2 expression and response to duodenal mucosa injury. *Journal of cell science* **125**, 5005-5014.
- Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE & Plevy SE. (2005). Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *The Journal of experimental medicine* **202**, 1703-1713.
- Holiga S, Hipp JF, Chatham CH, Garces P, Spooren W, D'Ardhuy XL, Bertolino A, Bouquet C, Buitelaar JK, Bours C, Rausch A, Oldehinkel M, Bouvard M, Amestoy A, Caralp M, Gueguen S, Ly-Le Moal M, Houenou J, Beckmann CF, Loth E, Murphy D, Charman T, Tillmann J, Laidi C, Delorme R, Beggiato A, Gaman A, Scheid I, Leboyer M, d'Albis MA, Sevigny J, Czech C, Bolognani F, Honey GD & Dukart J. (2019). Individuals with autism spectrum disorders display reproducible functional connectivity alterations. *Science translational medicine* **11**.
- Holingue C, Newill C, Lee LC, Pasricha PJ & Daniele Fallin M. (2018). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* **11**, 24-36.
- Hosie S, Ellis M, Swaminathan M, Ramalhosa F, Seger GO, Balasuriya GK, Gillberg C, Rastam M, Churilov L, McKeown SJ, Yalcinkaya N, Urvil P, Savidge T, Bell CA, Bodin O, Wood J, Franks AE, Bornstein JC & Hill-Yardin EL. (2019). Gastrointestinal dysfunction in individuals and mice expressing the autism-associated R451C mutation in neuroligin-3. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* **12**, 1043-1056.
- Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH & Mazmanian SK. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* **155**, 1451-1463.
- Huang WC, Chen Y & Page DT. (2016). Hyperconnectivity of prefrontal cortex to amygdala projections in a mouse model of macrocephaly/autism syndrome. *Nature communications* **7**, 13421.
- Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, Khoruts A, Geis E, Maldonado J, McDonough-Means S, Pollard EL, Roux S, Sadowsky MJ, Lipson KS, Sullivan MB, Caporaso JG & Krajmalnik-Brown R. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* **5**, 10.
- Kang DW, Ilhan ZE, Isern NG, Hoyt DW, Howsmon DP, Shaffer M, Lozupone CA, Hahn J, Adams JB & Krajmalnik-Brown R. (2018). Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe* **49**, 121-131.
- Kim YS & Leventhal BL. (2015). Genetic epidemiology and insights into interactive genetic and environmental effects in autism spectrum disorders. *Biological psychiatry* **77**, 66-74.



- Kushak RI, Buie TM, Murray KF, Newburg DS, Chen C, Nestoridi E & Winter HS. (2016). Evaluation of Intestinal Function in Children With Autism and Gastrointestinal Symptoms. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **62**, 687-691.
- Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Touchefeu Y, Vrignaud S, Naveilhan P, Galmiche JP, Bruley des Varannes S, Derkinderen P & Neunlist M. (2008). Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* **57**, 1741-1743.
- Margolis KG, Li Z, Stevanovic K, Saurman V, Israelyan N, Anderson GM, Snyder I, Veenstra-VanderWeele J, Blakely RD & Gershon MD. (2016). Serotonin transporter variant drives preventable gastrointestinal abnormalities in development and function. *The Journal of clinical investigation* **126**, 2221-2235.
- Meelu P, Marin R, Clish C, Zella G, Cox S, Yajnik V, Nguyen DD & Korzenik JR. (2014). Impaired innate immune function associated with fecal supernatant from Crohn's disease individuals: insights into potential pathogenic role of the microbiome. *Inflammatory bowel diseases* **20**, 1139-1146.
- Nevison C, Blaxill M & Zahorodny W. (2018). California Autism Prevalence Trends from 1931 to 2014 and Comparison to National ASD Data from IDEA and ADDM. *Journal of autism and developmental disorders* **48**, 4103-4117.
- Ruder B, Atreya R & Becker C. (2019). Tumour Necrosis Factor Alpha in Intestinal Homeostasis and Gut Related Diseases. *International journal of molecular sciences* **20**.
- Sasselli V, Boesmans W, Vanden Berghe P, Tissir F, Goffinet AM & Pachnis V. (2013). Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *The Journal of clinical investigation* **123**, 1763-1772.
- Sebastian VP, Salazar GA, Coronado-Arrazola I, Schultz BM, Vallejos OP, Berkowitz L, Alvarez-Lobos MM, Riedel CA, Kalergis AM & Bueno SM. (2018). Heme Oxygenase-1 as a Modulator of Intestinal Inflammation Development and Progression. *Frontiers in immunology* **9**, 1956.
- Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA & Costa-Mattioli M. (2019). Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* **101**, 246-259 e246.
- Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, Zink EM, Casey CP, Taylor BC, Lane CJ, Bramer LM, Isern NG, Hoyt DW, Noecker C, Sweredoski MJ, Moradian A, Borenstein E, Jansson JK, Knight R, Metz TO, Lois C, Geschwind DH, Krajmalnik-Brown R & Mazmanian SK. (2019). Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell* **177**, 1600-1618 e1617.
- Shouval DS, Biswas A, Kang YH, Griffith AE, Konnikova L, Mascanfroni ID, Redhu NS, Frei SM, Field M, Doty AL, Goldsmith JD, Bhan AK, Loizides A, Weiss B, Yerushalmi B, Yanagi T, Lui X, Quintana FJ, Muise AM, Klein C, Horwitz BH, Glover SC, Bousvaros A & Snapper SB. (2016). Interleukin 1beta Mediates Intestinal Inflammation in Mice and Individuals With Interleukin 10 Receptor Deficiency. *Gastroenterology* **151**, 1100-1104.
- Sun Y, Fihn BM, Sjoval H & Jodal M. (2004). Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut* **53**, 362-367.

- Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT & Conlon MA. (2012). Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Digestive diseases and sciences* **57**, 2096-2102.
- Yano T, Torisawa T, Oiwa K & Tsukita S. (2018). AMPK-dependent phosphorylation of cingulin reversibly regulates its binding to actin filaments and microtubules. *Scientific reports* **8**, 15550.
- Zheng P, Zeng B, Liu M, Chen J, Pan J, Han Y, Liu Y, Cheng K, Zhou C, Wang H, Zhou X, Gui S, Perry SW, Wong ML, Licinio J, Wei H & Xie P. (2019). The gut microbiome from individuals with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice. *Science advances* **5**, eaau8317.
- Zhu F, Guo R, Wang W, Ju Y, Wang Q, Ma Q, Sun Q, Fan Y, Xie Y, Yang Z, Jie Z, Zhao B, Xiao L, Yang L, Zhang T, Liu B, Guo L, He X, Chen Y, Chen C, Gao C, Xu X, Yang H, Wang J, Dang Y, Madsen L, Brix S, Kristiansen K, Jia H & Ma X. (2019). Transplantation of microbiota from drug-free individuals with schizophrenia causes schizophrenia-like abnormal behaviors and dysregulated kynurenine metabolism in mice. *Molecular psychiatry*.
- Zikopoulos B & Barbas H. (2010). Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 14595-14609.
- Zikopoulos B & Barbas H. (2013). Altered neural connectivity in excitatory and inhibitory cortical circuits in autism. *Frontiers in human neuroscience* **7**, 609.



## Résultats complémentaires

---

Au cours de nos expérimentations, nous avons mis en évidence une modification des fonctions digestives accompagnée d'un remodelage du SNE chez nos animaux suite à des lavements rectaux de surnageants fécaux de patients atteints de TSA. Les résultats de cette partie complémentaire viennent compléter l'étude réalisée dans l'article en préparation sur les surnageants fécaux de patients atteints de TSA. Au cours de ce projet, nous avons développé plusieurs modèles pour caractériser leurs effets sur les composants du tube digestif. Ces résultats non présentés dans l'article aident à la compréhension de la démarche de recherche réalisée pendant mon travail de thèse.

Dans le but de mieux comprendre et appréhender les modifications au niveau de la BEI, une étude *in vitro* sur un modèle cellulaire de BEI nous semblait indispensable pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux modifications d'expression des molécules de jonctions serrées. De nombreux modèles cellulaires de BEI existent au sein de la littérature comme les cellules HT-29, T-84, TC-7, Caco-2, etc. (Cavallini et al., 2018; Devriese et al., 2017; Pan et al., 2015). Ces cellules peuvent être cultivées par un système de transwell permettant une polarisation des CEI et l'apparition d'un pôle apical et d'un pôle basolatéral différenciés (Altay et al., 2019). Ce système permet de modéliser une monocouche cellulaire formant une barrière mature similaire à celle retrouvée dans le tube digestif. Au cours de notre étude, nous avons décidé d'utiliser des cellules Caco-2, une lignée de cellules épithéliales colorectales cancéreuses humaines largement utilisée au sein de la littérature pour étudier l'épithélium digestif (Pochard et al., 2016; Varon et al., 2009; Zhdanov et al., 2017). Dans le but d'étudier l'effet de notre traitement sur les fonctions de barrière, nous avons traité des cultures de Caco-2 avec les surnageants fécaux.

De plus, au cours de nos expériences *in vivo* et *in vitro* nous avons mis en évidence des différences dans l'expression d'ARN ou de protéines, et plus particulièrement au niveau des protéines neuronales. Nous avons effectivement mis en évidence une expression inverse entre le modèle *vivo* et *vitro* : nous observions par exemple une forte diminution de l'expression de la synapsine-1 dans le tissu de nos animaux, tandis que nous observions une augmentation de la synapsine-1 dans nos cultures de SNE traitées aux surnageants. Nous avons émis l'hypothèse que ces effets contraires pourraient provenir de l'effet des surnageants sur un autre acteur du tube digestif comme par exemple la BEI, capable de filtrer les médiateurs bactériens ou de synthétiser des médiateurs modifiant l'expression protéique du SNE (Moriez et al., 2009). Pour répondre à cette hypothèse, nous avons mis en place une co-culture de SNE et Caco-2 par un système de transwell. Ces cultures ont été traitées avec les surnageants fécaux afin de définir si les effets contraires observés proviennent de la présence de la BEI.

Parallèlement à cela, de plus en plus de publications démontrent l'effet du microbiote intestinal et de la transplantation fécale sur le comportement ou les structures centrales de l'hôte transplanté. Ces démonstrations sont les plus marquantes dans les souris GF qui présentent un remodelage du SNC suite à l'implantation d'un microbiote intestinal (Bercik et al., 2011; Sudo et al., 2004). Ces

modifications post-transplantation ont également été démontrées au niveau du comportement murin dans le cas de transplantation de flore fécale de patients atteints de TSA avec une augmentation de la stéréotypie et une diminution de l'interaction sociale chez les animaux (Sharon et al., 2019). Ces modifications comportementales sont aussi possibles chez l'Homme : suite à une greffe fécale provenant de personnes neurotypiques chez des patients atteints de TSA, il a été démontré des comportements autistiques-like moins marqués, des modifications qui peuvent persister jusqu'à deux ans après la greffe (Kang et al., 2019). De part ces informations, nous nous sommes interrogés sur la capacité de nos lavements par lavements rectaux et des métabolites qui les composent à modifier les structures du SNC de nos animaux.

Pour finir, il est également impossible de parler de remodelage des fonctions intestinales sans évoquer les modifications du microbiote intestinal chez les patients. De nombreuses études démontrent une altération de la composition du microbiote intestinal chez les patients atteints de TSA (De Angelis et al., 2013; Finegold et al., 2010; Kang et al., 2018) ainsi que dans les modèles animaux de TSA (Golubeva et al., 2017; Hsiao et al., 2013; Sauer et al., 2019). Nous avons donc réalisé un séquençage 16S à partir des échantillons de selles de patients sur un total de 36 patients atteints de TSA et 15 contrôles sains afin de caractériser les différences de composition de la flore bactériennes de nos patients.

### Effets dose des surnageants fécaux sur un modèle de barrière épithéliale *in vitro*

Dans le but de mimer l'effet du microbiote intestinal ou des composés présents dans le lumen intestinal, nous avons décidé d'utiliser un traitement au niveau apical de la monocouche de CEI. Quatre concentrations différentes ont été testées sur les Caco-2 : 1/5<sup>e</sup>, 1/10<sup>e</sup>, 1/50<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup>. A la suite de 72H de traitement, nous avons mesuré l'évolution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) ainsi que les perméabilités paracellulaire et transcellulaire.

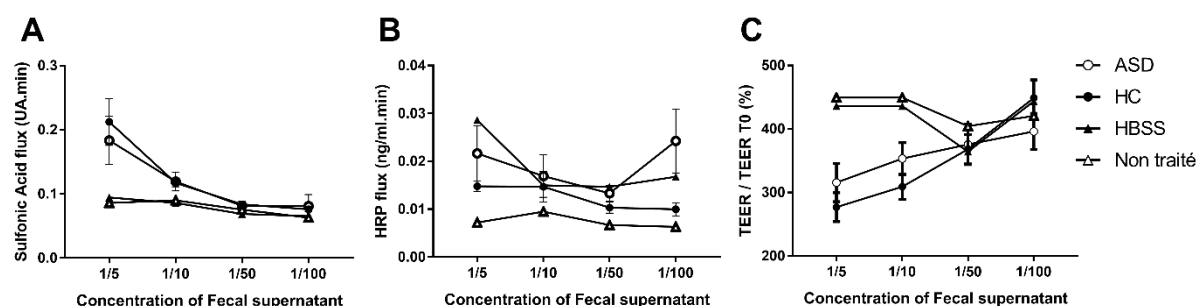


Figure 43 : Dose réponse des surnageants fécaux sur les fonctions de barrière d'une monocouche cellulaire de Caco-2. (A) Mesure de la perméabilité paracellulaire, (B) de la perméabilité transcellulaire et (C) de la résistance électrique transépithéliale (TEER) après un traitement de 72 heures par des surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC), de patients atteints de TSA (n=6 ; ASD), d'HBSS (solvant) à différentes concentrations (1/5<sup>e</sup>, 1/10<sup>e</sup>, 1/50<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup>) ou sans traitement. Les données représentent les moyennes  $\pm$ SEM.

Nous avons mis en évidence qu'à forte concentration, la TEER évolue peu en présence de surnageant par rapport à une condition sans traitement ou solvant seul (Figure 43), avec un effet dose-réponse dépendante. Cette non-évolution de la TEER, à forte concentration, est intimement liée à la perméabilité paracellulaire qui est augmentée. Cependant pour ces deux paramètres, quelle

que soit la concentration utilisée aucune différence n'apparaît entre le traitement de surnageants contrôles et celui de patients atteints de TSA. Concernant la perméabilité transcellulaire, nous avons observé des tendances à l'augmentation de la perméabilité transcellulaire pour les surnageants de patients atteints de TSA à la concentration de 1/5<sup>e</sup> et de 1/100<sup>e</sup>.

### Evaluation de la toxicité des surnageants fécaux

Les effets observés étant dose-dépendants, il était important de vérifier si les différences observées provenaient d'un effet toxique/léthal des composants de nos surnageants sur les CEI. Nous avons donc décidé de tester la viabilité mitochondriale, un indicateur de la viabilité cellulaire en culture, par le test de MTT (Stockert et al., 2018).

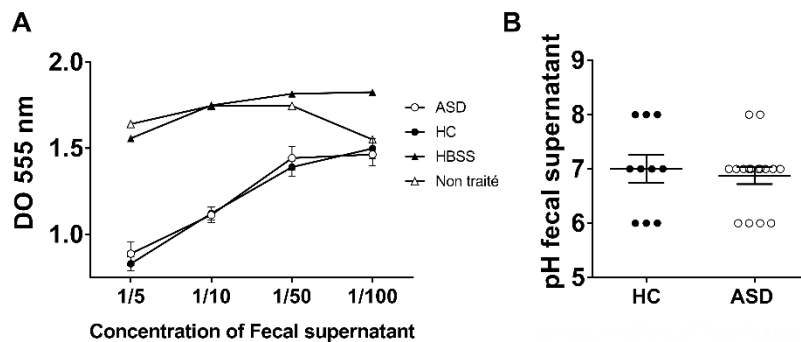


Figure 44 : Evaluation de la toxicité et du pH des surnageants fécaux.

(A) Evaluation de la viabilité mitochondriale des cellules Caco-2 après 72 heures de traitement à différentes concentrations de surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC), de patients atteints de TSA (n=16 ; ASD), d'HBSS (solvant) ou sans traitement. (B) Evaluation du pH des surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC) et de patients atteints de TSA (n=16 ; ASD). Les données représentent les moyennes  $\pm$ SEM.

Nous avons démontré qu'à forte concentration l'activité mitochondriale est affaiblie (d'environ 1/3) par rapport à des cellules non traitées ou traitées avec le solvant seul (Figure 44). A plus faible concentration (1/50<sup>e</sup> et 1/100<sup>e</sup>), nous avons démontré que l'activité mitochondriale est presque identique à celle des cellules non traitées.

De plus, nous savons qu'un pH acide ou basique peut modifier les paramètres et la formation d'une monocouche de CEI (Perdikis et al., 1998). Le dosage des pH pour l'ensemble de nos surnageants nous ont indiqués des pH proches de 7 avec une homogénéité de la variation de pH entre les contrôles sains et les patients atteints de TSA (Figure 44).

### Effets des surnageants fécaux sur les paramètres de la BEI *in vitro*

Suite aux différents tests d'évaluation de la viabilité cellulaire, nous avons sélectionné la concentration au 1/100<sup>e</sup> pour le traitement de nos cultures cellulaires.

L'expérience a été réalisée sur trois passages de cellules Caco-2, mettant en évidence une augmentation significative de la perméabilité transcellulaire chez les CEI traitées avec les surnageants fécaux de patients atteints TSA comparativement aux CEI traitées avec les surnageants fécaux de contrôles sains (Figure 45A). Cependant, aucune modification de la perméabilité paracellulaire ou de l'évolution de la TEER n'a été observée pour les patients atteints de TSA par rapport aux contrôles.

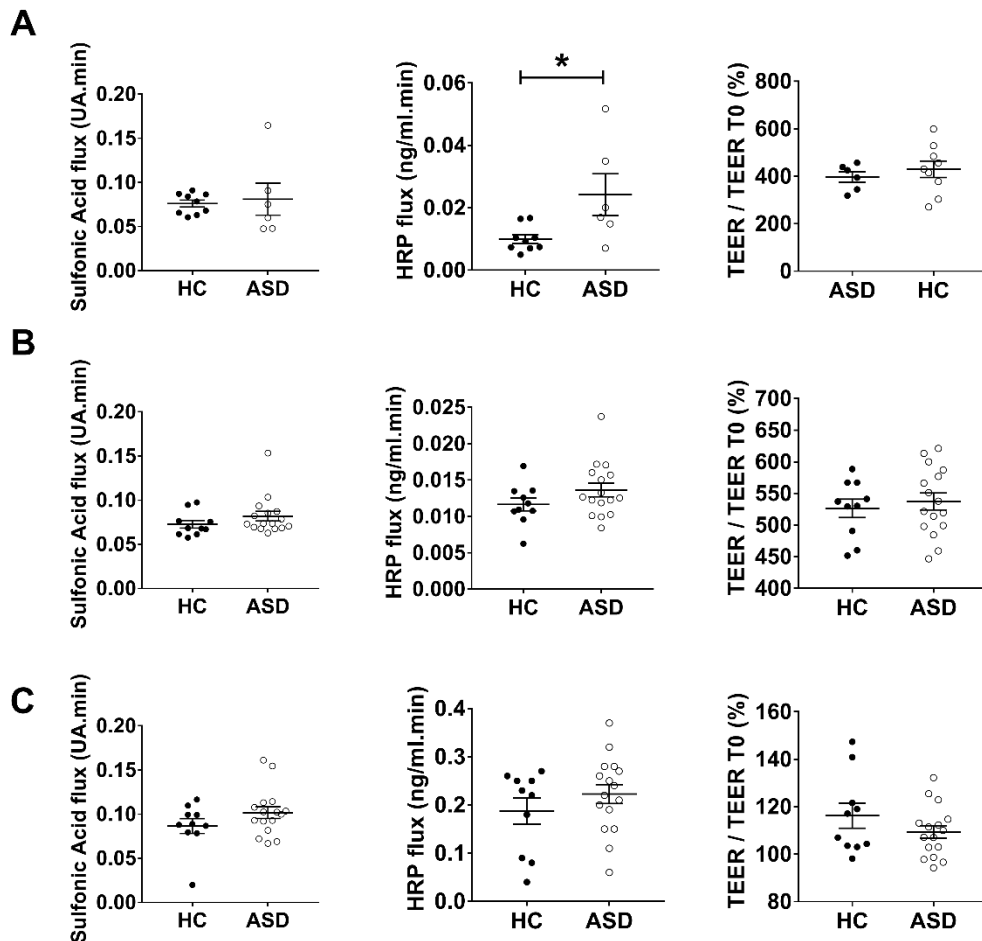


Figure 45 : Mesure des paramètres de barrière d'une monocouche cellulaire de Caco-2.

(A) Mesure de la perméabilité paracellulaire, transcellulaire et de l'évolution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) sur des Caco-2 traitées 72 heures aux surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC) et de patients atteints de TSA (n=6 ; ASD). (B) Mesure des mêmes paramètres sur un 2<sup>e</sup> batch de Caco-2 traitées 72 heures aux surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC) et de patients atteints de TSA (n=16 ; ASD). (C) Mesure des mêmes paramètres sur un 3<sup>e</sup> batch de Caco-2 traitées 72 heures aux surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC) et de patients atteints de TSA (n=16 ; ASD). Les données représentent les moyennes  $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, \* :  $p < 0.05$ .

Au cours de notre étude, le recrutement des patients a évolué aboutissant à un nombre de patient atteints de TSA plus conséquent. Nous avons donc décidé de refaire l'expérience afin de renforcer nos résultats statistiques. Ces expériences ont donc été répétées sur 3 passages identiques au 1<sup>er</sup> batch à partir d'une nouvelle ampoule des mêmes cellules.

Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une différence de perméabilité transcellulaire chez nos patients atteints de TSA comparativement aux contrôles en rajoutant des patients (Figure 45B). Néanmoins, en analysant uniquement les résultats des patients TSA et contrôles utilisés lors des premières expériences, les différences préalablement observées n'étaient pas reproduites (résultats non représentés).

Une troisième série d'expérience a été réalisée sur une nouvelle ampoule de cellule (Figure 45C). Pour ce 3<sup>e</sup> batch cellulaire, nous n'avons pas mis en évidence les résultats préalablement observés sur la perméabilité transcellulaire.

### Modélisation d'un modèle intestinal intégré *in vitro*

Deux expériences ont été réalisées en co-cultivant par une technique de transwell Caco-2 et SNE. Les Caco-2 ont été traitées au pôle apical par les différents surnageants fécaux, reproduisant ainsi un traitement dans le lumen digestif.

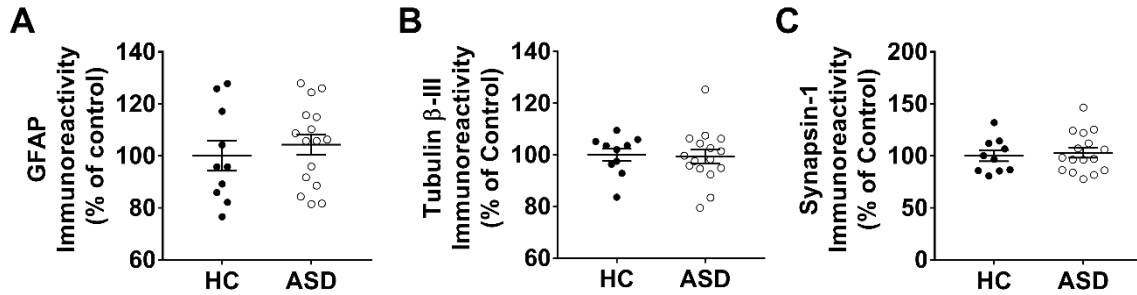


Figure 46 : Le traitement aux surnageants fécaux dans un modèle complexe *in vitro* n'altère pas l'expression des molécules gliales et neuronales.

Quantification par western blot de l'expression protéique de GFAP (A), Tubuline-βIII (B) et Synapsine-1 (C) dans les cultures de SNE co-cultivées en présence de Caco-2 avec traitement de 48 heures aux surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC) et de patients atteints de TSA (n=16 ; ASD). Les données représentent les moyennes ±SEM.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative pour l'expression des protéines du SNE dans les cultures traitées par les surnageants de patients atteints de TSA et les contrôles sains (Figure 46). Ces résultats ne reproduisent pas les résultats observés dans notre modèle animal *in vivo* et ne permettent pas d'expliquer les différences observées entre notre modèle *in vitro* et *in vivo*.

### Effets des surnageants fécaux sur le système nerveux central

Au cours de notre étude, nous avons récupéré différentes parties du cerveau telles que le cortex, connu pour subir des modifications de la connectivité dans les TSA (Ha et al., 2015) ainsi que l'amygdale, une zone cérébrale non modifiée dans les TSA.

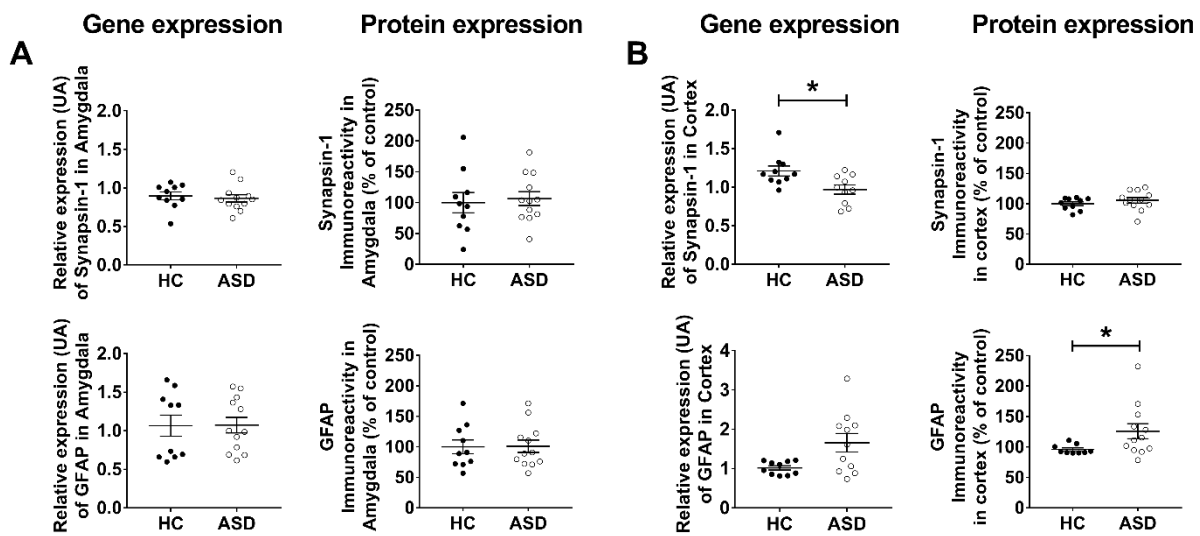


Figure 47 : Les surnageants fécaux induisent des modifications de l'expression génique et protéique de façon région spécifique. Quantification de l'expression des ARNm et des protéines GFAP et Synapsine-1 dans l'amygdale (A) et le cortex (B) de souris traitées aux surnageants fécaux de contrôles sains (n=10 ; HC) et de patients atteints de TSA (n=12 ; ASD). Les données représentent les moyennes ±SEM, Test de Mann-Whitney, \* :  $p < 0.05$ .



Nous avons montré que l'expression du marqueur de connectivité synapsine-1 ainsi que l'expression du marqueur glial GFAP n'étaient pas modifiées au niveau l'amygdale (Figure 47). Cependant, nous avons mis en évidence une diminution significative de l'expression de l'ARNm de la Synapsine-1 dans le cortex de nos animaux, ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de la GFAP.

### Altération du microbiote intestinal dans les troubles du spectre autistique

Au sein de la littérature, une dysbiose du microbiote intestinal a été démontrée chez les patients atteints de TSA (Kang et al., 2018). Nous avons réalisé un séquençage 16S afin d'étudier les proportions bactériennes relatives chez nos patients.

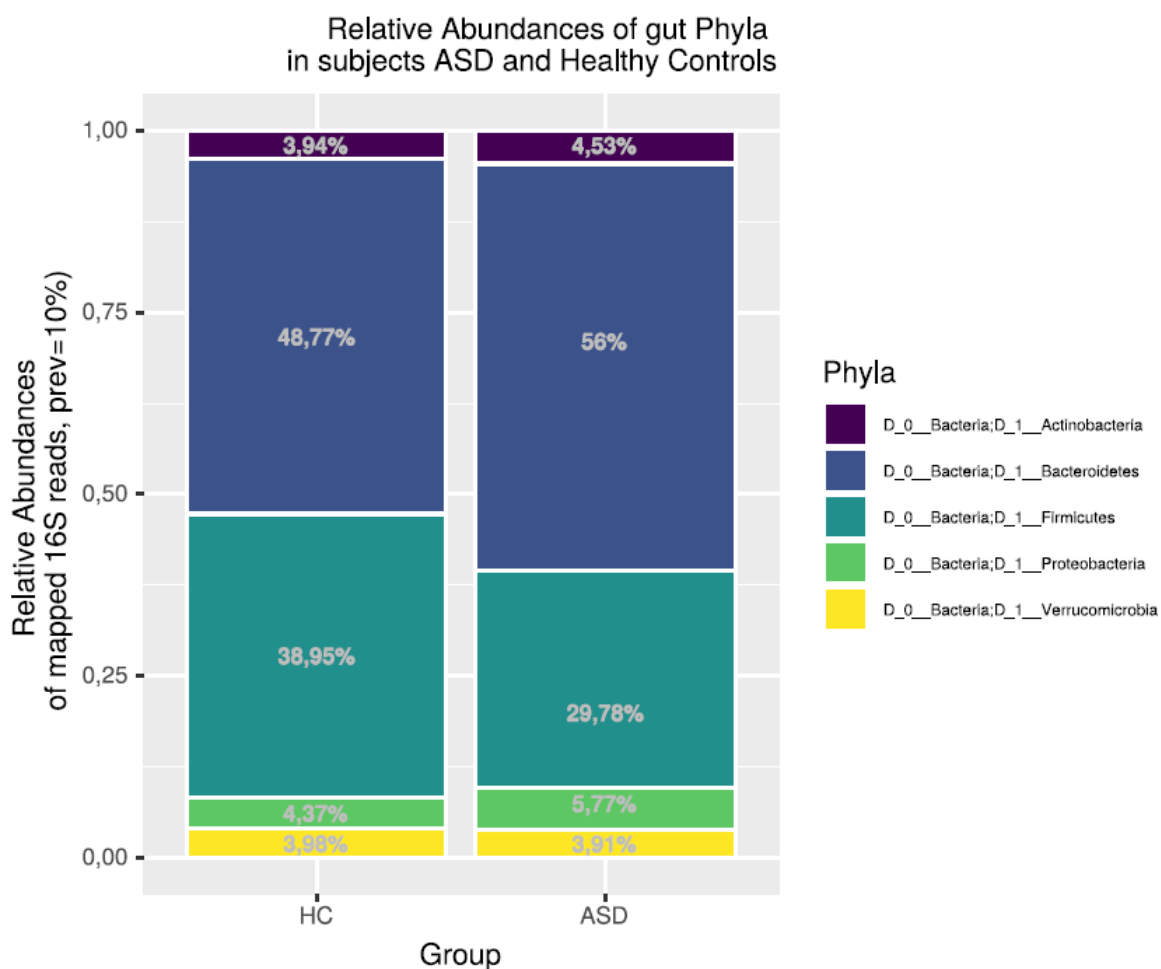


Figure 48 : Proportion relative des phyla bactériens dans nos échantillons. Contrôles sains (n=15 ; HC) et patients atteints de TSA (n=36 ; ASD).

Nous avons mis en évidence une tendance à la modification de la proportion relative des cinq phyla majoritaires avec une tendance à la diminution des *Firmicutes* et à l'augmentation des *Bacteroidetes*. Ces modifications se traduisent par la diminution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* chez les patients atteints de TSA (Figure 48).

## Interprétation des résultats complémentaires

A forte concentration, les surnageants fécaux peuvent modifier la perméabilité paracellulaire, transcellulaire et la TEER d'une monocouche de Caco-2. Cependant par le biais du test de MTT, nous avons démontré que les effets observés étaient dus à une toxicité de nos surnageants, induisant une diminution de la viabilité cellulaire et une mauvaise formation d'une barrière mature. La concentration du traitement a donc été choisie afin d'être le moins toxique pour les cultures cellulaires. Cependant, malgré le fait de s'affranchir de la toxicité de nos traitements, nous avons été confrontés à des difficultés de reproductibilité. Ces difficultés sur les cellules Caco-2 sont bien connues et discutées au sein de la communauté scientifique (Natoli et al., 2012). Nous avons donc pris l'initiative de nous concentrer sur les effets *in vivo* observés sur la BEI de nos animaux, le modèle cellulaire n'étant pas le plus adapté pour caractériser les effets des surnageants sur la fonction de barrière.

En parallèle de cela, nous cherchions à expliquer les différences observées entre nos modèles de culture de SNE et notre modèle animal au niveau de l'expression des molécules neuronales et gliales. Nous avons émis l'hypothèse qu'un acteur supplémentaire, comme la BEI, pouvait modifier la réponse aux surnageants.

Comme discuté précédemment, nous avons rencontré des problèmes de reproductibilité avec le modèle Caco-2 disponible au laboratoire. Pour palier à cette difficulté, nous aurions pu utiliser le modèle cellulaire de TC-7, un sous clone des cellules Caco-2, indiqué comme un modèle ayant des résultats davantage reproductibles (Chantret et al., 1994; Grès et al., 1998). Cependant, ces CEI nécessitent un taux de CO<sub>2</sub> de 10% et un milieu de culture spécifique, rendant sa coculture avec le SNE incompatible. Nous avons réalisé différentes expériences de modifications du taux de CO<sub>2</sub> dans la culture de ces CEI qui ont démontré une diminution de la viabilité cellulaire, ainsi qu'une incapacité à former une BEI fonctionnelle (résultats non représentés). Le SNE ne pouvant pas être cultivé à un taux de 10% de CO<sub>2</sub>, nous avons dû utiliser notre modèle initial de Caco-2 formant une BEI mature dans des conditions de culture similaires à celle du SNE.

Les résultats obtenus pour ce système de coculture en transwell nous laissent penser que la BEI n'est pas l'acteur expliquant la différence observée entre les cultures *in vitro* et le modèle *vivo*, ou du moins n'est pas le seul acteur responsable de ces différences.

D'autres hypothèses restent à être explorées comme les effets d'un traitement aux surnageants fécaux sur une coculture de SNE et Caco-2 en présence de cellules immunitaires. Nous avons effectivement observé une réponse inverse au niveau de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) entre notre modèle animal et nos cultures de SNE. Ceci nous suggère une potentielle implication du système immunitaire, connu pour interagir directement avec les neurones entériques et modifier l'expression protéique des neurones (Yoo and Mazmanian, 2017). Nous émettons également l'hypothèse d'un effet du traitement antibiotique, capable à lui seul de modifier l'expression protéique et/ou les fonctions digestives comme démontré dans d'autres études (Bistoletti et al., 2019; Lowe et al., 2018; Ryu et al., 2017).

Les difficultés de reproductibilité dans nos deux systèmes de cultures, nous font penser que des composants présents dans nos surnageants fécaux peuvent être instables/labiles et peuvent se

dégrader avec le temps malgré une conservation à -80°C. Ce phénomène est déjà connu pour certains acides gras (Nessel et al., 2019). Effectivement les premières expériences sur Caco-2 et SNE ont été réalisées en utilisant des surnageants fécaux fraîchement préparés tout comme l'expérimentation *in vivo*. Les tentatives de reproductibilité sur le modèle de Caco-2 et les expériences de co-culture SNE+Caco-2 ont été réalisées à partir de surnageants fécaux stockés depuis une plus longue durée à -80°C. Il nous était malheureusement impossible de produire fraîchement du surnageant pour chaque expérience à cause de la limitation en quantité limitée de selles.

En plus des modifications intestinales observées dans notre modèle animal, nous avons démontré une modification région-spécifique de l'expression des molécules neuronales et gliales au niveau central. Le phénomène d'augmentation de l'expression de GFAP est souvent retrouvé lors de gliose au niveau central (Anderson et al., 2014), sous-tendant un mécanisme d'inflammation central chez nos animaux. Il serait intéressant dans une étude ultérieure, de réaliser des tests comportementaux chez nos animaux afin de déterminer si le traitement aux surnageants fécaux est capable d'induire une modification comportementale chez les animaux, comme démontré lors d'une transplantation fécale provenant de patients atteints de TSA (Sharon et al., 2019).

En dernier lieu, l'implication du microbiote intestinal dans les TSA, et plus particulièrement dans les troubles digestifs sont de plus en plus étudiés (Saurman et al., 2020). Nos résultats démontrent une modification de la proportion relative des phyla bactériens chez nos patients, résultats cohérents avec ceux d'autres études menées sur des patients atteints de TSA (Finegold et al., 2010; Lee et al., 2017b). L'altération des phyla majoritaires pourraient être la cause de la modification des concentrations en métabolites dosés dans nos surnageants fécaux et pourraient potentiellement expliquer l'apparition de troubles gastro-intestinaux chez nos patients. Cependant nos résultats actuels sont à analyser avec précaution car lors du séquençage de nos échantillons, les contrôles sains et les patients atteints de TSA ont été séquençés séparément. Ce séquençage en deux étapes a induit une différence importante dans la profondeur de séquençage entre les deux groupes. Les différences relatives observées pourraient simplement provenir d'un artefact lors du traitement bio-informatique, qui nécessite d'égaliser le nombre de lecture de séquence entre les deux groupes. Afin de s'affranchir de ce potentiel artefact, nous allons réaliser un second séquençage incluant l'ensemble de nos échantillons en une seule fois.

Ainsi au cours de notre étude, nous avons été confrontés à des difficultés de reproductibilité au niveau de nos expériences *in vitro*. Nous avons démontré que la différence entre nos deux modèles ne s'expliquait pas uniquement par la présence de la BEI, faisant intervenir d'autres acteurs. De plus, nous avons démontré une modification de l'expression des marqueurs neuronaux et gliaux de façon structure-spécifique au niveau central chez nos animaux traités, ainsi qu'une modification des proportions relatives des phyla bactériens chez nos patients atteints de TSA, résultats cohérents avec ceux de la littérature.

## Discussion

---

Mes travaux de thèse s'intègrent dans le concept émergent de l'importance de la période périnatale pour la programmation de la santé et des maladies chroniques. A ce jour les mécanismes clefs sous-jacents au développement et à la maturation des fonctions digestives restent encore méconnus. D'autre part, les interactions entre facteurs environnementaux, en particulier le microbiote, avec le développement et le fonctionnement de ces organes durant la période post-natale restent aussi à être mieux appréhender dans le but de comprendre non seulement les pathologies du nouveau-né mais aussi les conséquences à long terme de ces interactions sur la santé et/ou dans les pathologies.

Dans ce contexte général, mon travail de thèse était organisé en deux parties. L'une plus fondamentale visant à caractériser le rôle de la sémaphorine 3A dans le développement et la maturation du SNE, et l'autre plus translationnelle visant à caractériser le rôle du microbiote intestinal dans les dysfonctions digestives observées au cours des TSA.

### **La sémaphorine 3A : un acteur dans la mise en place du SNE**

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une expression de la molécule sémaphorine 3A et de son récepteur NRP1 (Pasterkamp, 2012) au niveau du tube digestif. L'expression de ces molécules varient au cours du développement post-natal et possède une localisation spécifique. Effectivement, nous avons mis en évidence que le récepteur NRP1 est plus particulièrement présent au niveau des prolongements des neurones entériques, avec une forte expression au niveau des cônes de croissance axonaux, alors que la sémaphorine 3A est détectée sous forme d'agrégats à l'interface de la couche musculaire et du plexus myentérique ainsi qu'au niveau du SNE. Des études préalables par hybridation *in situ* démontrent que la sémaphorine 3A n'est pas exprimée au niveau du SNE (Jiang et al., 2015) mais plutôt au niveau du mésenchyme à proximité. En accord avec ces études précédentes, nos résultats indiquent que certaines cellules musculaires sont immunoréactives pour la sémaphorine 3A. Nous émettons donc l'hypothèse que les cellules musculaires expriment et secrètent la sémaphorine 3A, même si la source de l'expression de la sémaphorine 3A reste à confirmer au niveau du tube digestif.

Au niveau fonctionnel, nous avons démontré que la sémaphorine 3A, de façon similaire à son action dans le SNC (Goshima et al., 2016), inhibe la pousse axonale et diminue la connectivité neuronale au niveau du SNE. Cet effet est mis en évidence par une réduction des extensions axonales et une diminution de la densité d'agrégats de synapsine-1, une molécule impliquée dans les fonctions synaptiques. Nous émettons l'hypothèse que la sémaphorine exprimée par le muscle restreindrait l'élongation des prolongements neuronaux et limiterait donc les projections neuronales ectopiques dans les autres couches du tube digestif. Le contrôle négatif de la sémaphorine 3A sur la densité des synapses suggère qu'elle limiterait également la connectivité neuronale. La mise en place du SNE est une étape cruciale dans l'acquisition des fonctions digestives (Furness, 2006), nous pouvons proposer que des variations d'expression ou

l'expression de formes mutées de la sémaphorine 3A pourraient affecter la formation du réseau neuronal du SNE, et en conséquence certaines fonctions digestives, en particulier la motricité.

La délétion de la sémaphorine 3A chez la souris au stade embryonnaire a montré une migration précoce des NCC de la crête neurale au niveau du tube digestif (Anderson et al., 2007), néanmoins les auteurs n'ont pas étudié les effets fonctionnels à plus long terme chez le raton ou à l'âge adulte. Chez le poisson-zèbre, l'inactivation d'expression de la sémaphorine 3A n'a aucun effet sur le nombre de neurones du SNE (Jiang et al., 2015), mais la structure et la complexité du réseau axonal n'ont pas été étudiées. Notre étude, ciblée sur des étapes de maturation du réseau neuronal, indique que la sémaphorine 3A régule la connectivité neuronale. Ainsi, il semblerait que la sémaphorine 3A régule la migration des cellules progénitrices au stade embryonnaire, sans modifier la différenciation neuronale, et qu'elle aurait une action sur la structuration du SNE au stade post-natal. Néanmoins, la sémaphorine 3A n'est pas le seul facteur en cause dans les processus de maturation du SNE, ceux-ci sont contrôlés par une combinaison de multiples facteurs tels que le sonic hedgehog (Jin et al., 2015).

Pour mieux comprendre l'implication de la sémaphorine 3A dans la mise en place du réseau neuronal du SNE ainsi que les conséquences fonctionnelles, un modèle animal de délétion et de surexpression de la sémaphorine 3A pourrait être utilisé pour une analyse à des stades postnatals précoces et chez l'adulte.

### **La sémaphorine 3A impliquée dans la maladie de Hirschsprung**

Au niveau du tube digestif, la pathologie neurodéveloppementale la plus référencée est la maladie de Hirschsprung. Cette pathologie aboutit à une absence du SNE au niveau du colon terminal, avec de forts déficits en motricité digestive (Bondurand and Southard-Smith, 2016).

Dans notre étude nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de la synapsine-1 chez ces patients, diminution inversement corrélée à l'expression de la sémaphorine 3A au niveau du tube digestif. Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de la sémaphorine 3A chez les patients avec la maladie de Hirschsprung pourrait être un facteur potentiellement impliqué dans la régulation de l'expression de la synapsine-1, et par conséquent dans la connectivité neuronale. Cependant notre étude ne permet pas d'affirmer que la sémaphorine 3A joue un rôle dans les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Hirschsprung.

Par ailleurs, appuyant le rôle potentiel de la sémaphorine 3A dans la maladie de Hirschsprung, il a été démontré dans des modèles animaux de cette pathologie une surexpression de la sémaphorine 3A (Fujiwara et al., 2018), phénomène retrouvé chez des patients atteints de la maladie de Hirschsprung (Luzón-Toro et al., 2013; Wang et al., 2011a). Ces modèles animaux présentent également une modification de l'expression de *Crmp1* et *Dpys13*, des molécules requises dans la voie de signalisation de la sémaphorine 3A (Heanue and Pachnis, 2006). De plus, il a été démontré différentes mutations de la sémaphorine 3A chez les patients atteints de Hirschsprung (Gunadi et al., 2016; Jiang et al., 2015; Luzón-Toro et al., 2013; Wang et al., 2012b). Du fait du polymorphisme du gène de la sémaphorine 3A chez les patients atteints de Hirschsprung, l'impact de chaque mutation sur le développement du SNE est à caractériser. Pour cela, il pourrait être intéressant d'étudier de manière séparée chaque mutation répertoriée, et de caractériser leurs

impacts sur les fonctions digestives pour mieux comprendre la pathologie. Par une technique similaire à celle utilisée dans notre étude, nous pourrions étudier l'effet direct des mutations sur la mise en place du réseau nerveux en culture.

Une meilleure compréhension de l'implication de la sémaphorine 3A dans les mécanismes de maturation du SNE est primordiale pour une meilleure appréhension des mécanismes physiopathologiques dans les pathologies neurodéveloppementales.

### **Choix du modèle *in vivo* d'étude des effets du microbiote de patients atteints de TSA sur les fonctions digestives et le SNE**

Afin de caractériser l'impact du microbiote intestinal de patients atteints de TSA sur les fonctions digestives, nous avons fait le choix d'utiliser un transfert par surnageant fécaux dans un modèle GF-like induit par traitement antibiotique (Reikvam et al., 2011; Schubert et al., 2015). Ce choix était basé sur plusieurs hypothèses : pour le choix du transfert par surnageant fécaux, nous avons émis l'hypothèse que les effets du microbiote sur son hôte étaient médiés par des métabolites ou composés bactériens présents dans les selles. Aussi, le transfert de ces médiateurs dans le modèle animal sain devait reproduire les dysfonctions observées chez les patients. De telles approches ont déjà été validées dans des études précédentes (Annaházi et al., 2013; Dabek et al., 2011; Kim et al., 2011a) et permettent de transférer potentiellement l'ensemble des facteurs solubles présents lors du prélèvement des selles. Cependant cette approche possède aussi des limites car les médiateurs sont labiles (AGCC, NO) et la technique de production ne permet pas de récupérer l'intégralité des métabolites (Gao et al., 2009).

Le choix de ne pas faire de transplantation de microbiote fécal a aussi été justifié par le fait que toutes les populations bactériennes du donneur ne colonisent pas le nouvel hôte. Lors d'une transplation du microbiote fécal, la colonisation bactérienne reflète seulement en partie la population de l'hôte donneur (De Palma et al., 2017). Les métabolites produits dépendent aussi de la nourriture des animaux et peuvent être influencés par des facteurs confondants.

Cependant, un des inconvénients de la technique par surnageant est la quantité limitée de selles pour réaliser des expériences avec un traitement chronique. Dans l'hypothèse de la mise en place d'un traitement chronique, la transplantation de microbiote fécal représente une alternative intéressante et complémentaire de notre étude.

D'autre part, le choix de travailler avec des souris GF-like nous a semblé opportun par rapport à de véritables GF pour plusieurs raisons. D'une part, d'un point de vue pratique nous n'avons pas la possibilité de travailler avec des souris GF. D'autres part et de façon plus importante, les souris GF ont des défauts systémiques de développement et de maturation des fonctions digestives et du SNE (Collins et al., 2014; De Vadder et al., 2018; Hayes et al., 2018; Jakobsson et al., 2015; Kabouridis et al., 2015; McVey Neufeld et al., 2015). De ce fait le choix d'un modèle inductible semblait plus intéressant même si le choix des GF-like possède des limites. Ce modèle, affranchi des anomalies de développement et de maturation, possède cependant des caractéristiques différentes des souris conventionnelles comme une modification de la morphologie du caecum,

du temps de transit, de la taille des villosités et un remodelage de l'épithélium digestif (Ekmekci et al., 2017; Kennedy et al., 2018; Reikvam et al., 2011; Wilen et al., 2018).

En dernier lieu nous avons pris la décision de travailler sur des souris adultes, plutôt que des animaux nouveau-nés pour observer le remodelage des fonctions digestives et du SNE. La raison majeure de ce choix est due au recrutement de nos patients adultes avec un microbiote intestinal différent de celui de l'âge périnatal (Derrien et al., 2019). L'utilisation d'animaux nouveau-nés reste cependant dans le futur un choix intéressant pour comprendre l'impact du microbiote dans les TSA lors de la fenêtre périnatale, période où les fonctions digestives se mettent en place.

## **Des modifications digestives induites par les surnageants**

### **I. Atteintes de la BEI**

Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de différence sur la perméabilité intestinale totale de nos animaux, mais nous avons observé une diminution de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire au niveau du colon. Ces résultats diffèrent de ceux d'autres études utilisant un modèle animal génétique d'autisme (Coretti et al., 2017; Sauer et al., 2019) ou d'infection maternelle (Hsiao et al., 2013). Ces études indiquent une augmentation de la perméabilité intestinale totale ainsi qu'une augmentation au niveau colique (Golubeva et al., 2017). Cette augmentation de perméabilité chez l'animal, retrouvée dans la littérature, est en adéquation avec l'augmentation de perméabilité retrouvée chez l'Homme (D'Eufemia et al., 1996; de Magistris et al., 2010).

Cependant les altérations de perméabilité intestinale chez l'Homme ne sont pas retrouvées dans l'intégralité des études (Navarro et al., 2015; Robertson et al., 2008), laissant penser que des sous-groupes de patients sont davantage susceptibles à des altérations de perméabilité tandis que d'autres n'ont pas d'atteintes de la perméabilité (Gabriele et al., 2016; de Magistris et al., 2010). Appuyant cette hypothèse, une étude de transplantation de microbiote fécal à partir de selles de patients atteints de TSA démontre qu'il n'y a pas d'altération de la perméabilité totale chez les animaux (Sharon et al., 2019). L'ensemble de ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse que nos résultats contradictoires avec la littérature pourraient s'expliquer par la sélection d'un sous-groupe de patients.

Ajouté à cela, l'absence de modification de la perméabilité totale peut être due à un facteur technique puisque nos lavements rectaux ne remontent pas plus haut que le caecum (Suply et al., 2012) alors que notre protocole ne permettait de mesurer que la perméabilité de l'intestin grêle, du fait du ralentissement du transit dans ce modèle animal.

Renforçant l'idée d'atteinte de la BEI nous avons mis en évidence un remodelage de l'épithélium traduit par une diminution de l'expression protéique des constituants des jonctions serrées. Il est observé au sein de la littérature une modification identique de l'expression des molécules de jonctions serrées dans les TSA (Coretti et al., 2017; Cristiano et al., 2018; Fiorentino et al., 2016; Sauer et al., 2019). Cependant la diminution de leurs expressions devrait augmenter la perméabilité intestinale contrairement à nos résultats (Otani et al., 2019). Cette conséquence inverse au niveau fonctionnel pourrait s'expliquer par une modification de la balance

phosphorylation/déphosphorylation de ces protéines, un mécanisme connu pour jouer un rôle dans la perméabilité intestinale (Fan et al., 2019; Iden et al., 2012).

Dans notre étude, les différences de perméabilité peuvent être également dues à des phénomènes de réparation de la BEI : lors d'un stress aigu, ou d'une lésion, des phénomènes de réparation de la BEI se traduisent par une augmentation de la prolifération des CEI et un renforcement de la BEI (Dignass, 2001; Taupin and Podolsky, 2003). Ces processus de réparation peuvent être influencés par des métabolites bactériens comme les AGCC ou les sels biliaires (Han et al., 2015; Mroz et al., 2018). Nos résultats pourraient donc s'expliquer par le fait que notre traitement, similairement à un stress aigu, ou une lésion, déclenche une surexpression de facteurs antioxydants et active les mécanismes de réparation de la BEI diminuant ainsi la fonction de perméabilité intestinale.

## II. Atteinte de la motricité

L'application de nos traitements de surnageants fécaux par lavements rectaux n'a démontré aucune altération de la motricité digestive par rapport aux souris contrôles. Ces résultats sont contradictoires à ceux référencés dans la littérature qui démontrent une atteinte de la motricité digestive dans les modèles animaux de TSA (Fröhlich et al., 2019; Hosie et al., 2019; James et al., 2019) mais également chez l'Homme (Gabriele et al., 2016; Hsiao, 2014; Iovene et al., 2017). Cette absence d'impact sur la motricité peut être due aux conséquences d'utilisation de notre modèle animal traité par antibiotiques qui montre une diminution basale de la motricité digestive (Kennedy et al., 2018). L'application d'une transplantation de microbiote fécal, comparable à un traitement chronique, nous permettrait de mieux appréhender les modifications de motricité induites par le microbiote. Nous pourrions aussi réaliser des tests de provocation de la motricité digestive par stimulation des racines sacrées pour observer de potentielles différences (Rakhilin et al., 2019). D'autre part ce résultat pourrait provenir de la faible sensibilité de la méthode utilisée pour évaluer la fonction de motricité digestive. Il serait intéressant par la suite de développer des approches plus fines comme l'utilisation d'une cuve d'organe isolé (Gallego et al., 2018).

Malgré tout, nous avons mis en évidence une diminution du poids des selles, potentiellement due à une modification du SNE (Liang et al., 2016). Les modifications du SNE sont responsables d'un grand nombre de pathologies digestives expliquant les modifications de perméabilité mais aussi les troubles de motricité (Sasselli et al., 2012).

## Des modifications de la réponse inflammatoire

Dans notre étude sur modèle animal, nous avons mis en évidence une diminution de l'inflammation intestinale traduite par une baisse de l'expression génique de TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , accompagnée d'une augmentation de l'expression de HO-1, une molécule antioxydante et anti-inflammatoire. Nos résultats sont en contradiction avec les études précédentes sur l'utilisation de surnageant fécaux, qui montrent une augmentation de l'inflammation digestive même chez les animaux recevant le surnageant de contrôles sains (Dabek et al., 2011). Cependant des études démontrent que lors d'une transplation du microbiote fécal, l'inflammation du tube digestif n'est pas systématique (Sharon et al., 2019), et peut même diminuer l'inflammation digestive (Sun et al., 2018). Néanmoins nos résultats ne sont pas comparables à ceux d'une transplation de



microbiote fécal, notre traitement restant assimilable à un traitement aigu. Pour pouvoir comparer nos résultats aux conséquences d'une transplation de microbiote fécal, il faudrait augmenter la durée du traitement afin de déterminer si les effets de diminution des phénomènes inflammatoires sont identiques.

D'autre part la diminution de l'expression des facteurs pro-inflammatoires et l'augmentation de HO-1 pourraient expliquer la modification de perméabilité observée. HO-1 est connue pour protéger des ruptures de la barrière en diminuant l'expression des molécules pro-inflammatoires par les CEI et en induisant un renforcement des jonctions serrées via l'augmentation de l'expression de molécules telles que ZO-1 ou l'occludine (Chi et al., 2018; He et al., 2018; Wang et al., 2012c).

### **Des modifications des fonctions associées à un remodelage du SNE**

Dans notre étude, nous avons mis en évidence un remodelage des molécules du SNE, un résultat cohérent avec la littérature concernant les TSA. En effet les modèles animaux de TSA montrent des modifications du nombre de neurones entériques jusqu'à des variations de 50% (Bernier et al., 2014), une diminution du nombre de cellules 5-HT positives et de la quantité de 5-HT (de Theije et al., 2014), une hypoplasie du réseau nerveux (Margolis et al., 2016) ainsi qu'une densité du plexus myentérique diminuée (Golubeva et al., 2017).

Dans notre modèle, le remodelage du SNE est traduit par une modification de l'expression des molécules de connectivité telles que tubuline  $\beta$ -III et synapsine-1, mais également des molécules gliales GFAP ou S100 $\beta$ . Ces molécules neuronales sont des marqueurs de connectivité neuronale exprimés dans le SNE (Duchalais et al., 2018; Le Berre-Scoul et al., 2017) et connus pour avoir une expression modifiée de façon région-spécifique chez les patients atteints de TSA au niveau central (Abdelli et al., 2019; Chen et al., 2014; Holiga et al., 2019), tout comme les marqueurs gliaux (Boesmans et al., 2015) qui sont davantage exprimés dans les TSA (Bailey et al., 2013; Crawford et al., 2015). Les conséquences fonctionnelles de ce remodelage restent néanmoins à être explorées. Des approches électrophysiologiques ou des modèles de culture cellulaire plus complexes permettraient de mieux comprendre les conséquences de ce remodelage sur les fonctions digestives.

Dans notre modèle animal, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de ces protéines contrebalancée par une augmentation de leurs ARNm, un phénomène pouvant se traduire par une tentative de compensation de la cellule en produisant d'avantage d'ARNm suite à la diminution de l'expression protéique (Csárdi et al., 2015; Liu et al., 2015; Vogel and Marcotte, 2012).

Ces modifications d'expression protéique n'ont cependant pas été reproduites sur des cultures de SNE, où nous avons mis en évidence un effet opposé traduit par une augmentation des protéines synapsine-1 et tubuline  $\beta$ -III. Cet effet inverse peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. L'application des surnageants dans le cas des cultures se fait en contact direct avec le SNE tandis que dans notre modèle animal la barrière est capable de filtrer certains médiateurs ou de moduler l'effet du micro-environnement sur le SNE. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un modèle de coculture de SNE+CEI qui ne nous permet pas d'expliquer les différences observées

entre notre modèle cellulaire et notre modèle animal. Ces résultats nous amènent à penser qu'un ou plusieurs autres acteurs peuvent venir influencer le remodelage du SNE induit par le traitement aux surnageants fécaux. Le système immunitaire pourrait être l'un de ces acteurs puisque l'expression génique des facteurs pro-inflammatoires est aussi inversée entre nos cultures et notre modèle animal. Pour mieux caractériser l'implication du système immunitaire dans le remodelage, il serait possible de réaliser une coculture SNE + CEI + cellules immunes (Kim et al., 2011b).

Une autre hypothèse pourrait expliquer ces différences : les cultures utilisées pour la modélisation cellulaire proviennent de tissus embryonnaires avec un système nerveux en cours de maturation, tandis que dans notre modèle animal le SNE est déjà mature et mis en place. Les composants présents dans les surnageants peuvent avoir des effets différents selon le stade du développement du SNE, comme cela a été démontré pour le butyrate en fonction de la période où il est administré (Soret et al., 2010; Suply et al., 2012). Pour définir si l'effet inverse provient d'une fenêtre d'action temporelle du traitement, nous pourrions réaliser des cultures de SNE à partir de rat adulte (Brun and Akbarali, 2018; Wang et al., 2018).

Une dernière hypothèse peut expliquer ces différences de remodelage : l'impact du traitement par antibiotiques. Il est démontré que ce traitement est capable de modifier l'expression protéique au niveau du tube digestif (Bistoletti et al., 2019; Lowe et al., 2018; Ryu et al., 2017). Ces modifications ont la possibilité d'altérer l'effet des surnageants fécaux, mais le traitement par antibiotiques peut aussi induire des effets secondaires par interaction, un phénomène démontré pour certains traitements (Hildebrand and Hill, 1994).

### **Les sels biliaires secondaires : acteurs potentiels des effets du surnageant sur le SNE et les fonctions digestives**

Le microbiote est capable d'interagir avec son hôte de façon directe ou indirecte par la libération de métabolites. De grandes familles de métabolites bactériens sont connues et étudiées pour leurs implications dans le remodelage du tube digestif et de ces fonctions. Les AGCC ou les sels biliaires sont capables de renforcer ou diminuer l'intégrité structurelle de la BEI, et modulent le temps de transit (Alemi et al., 2013; Verbeke et al., 2015; Yan and Ajuwon, 2017). Dans notre étude nous avons démontré que contrairement à la littérature (Adams et al., 2011; De Angelis et al., 2013), nous n'avons pas observé de différence de concentration en AGCC dans les selles de nos patients.

Néanmoins, nous avons mis en évidence pour la première fois une modification de la concentration en sels biliaires chez les patients atteints de TSA, phénomène préalablement démontré dans un modèle animal de TSA (Golubeva et al., 2017). Nous avons plus particulièrement démontré une différence de concentration pour le sel biliaire secondaire DCA. Ce sel biliaire est connu pour être délétère pour la BEI à une concentration élevée : il induit une augmentation de l'inflammation intestinale, est pro-apoptotique, pro-tumoral et antiprolifératif pour les CEI (Dossa et al., 2016; Stenman et al., 2013). Ces processus aboutissent à une augmentation de la perméabilité intestinale, une atteinte fonctionnelle souvent retrouvée chez les patients atteints de TSA (D'Eufemia et al., 1996; de Magistris et al., 2010). L'effet du DCA sur la perméabilité intestinale peut également provenir partiellement d'une modification du SNE

comme démontré dans une étude où l'application du DCA n'altère plus la perméabilité une fois le plexus myentérique inhibé (Sun, 2004). Néanmoins, l'effet observé provient majoritairement d'un dommage de la monocouche de CEI plutôt que d'une régulation neuronale (Forsgård et al., 2014).

Il est important de noter que l'effet du DCA est concentration-dépendant et la majorité des études l'utilise à des doses non physiologiques. A dose physiologique le DCA promeut la prolifération de Caco-2 et possède un effet anti-apoptotique (Barrasa et al., 2013; Cheng and Raufman, 2005). Cette notion de dose pourrait expliquer le phénomène de renforcement de la BEI observé dans notre modèle animal.

Afin de mieux caractériser l'implication du DCA dans les troubles digestifs observés dans la pathologie, un traitement chez des animaux avec ce sel biliaire à des concentrations similaires à celles observées dans les surnageants fécaux de notre cohorte de patients permettrait de mieux comprendre son implication dans les troubles digestives observés.

### **Le microbiote intestinal : acteur des troubles digestifs dans TSA ?**

Nous avons apporté des données préliminaires concernant la composition du microbiote intestinal chez nos patients. Bien que nous n'ayons pas montré de différence significative parmi les grands phyla bactériens, nous avons observé une tendance à la diminution des *Firmicutes* et à l'augmentation des *Bacteroidetes*. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés au sein de la littérature indiquant les mêmes modifications sur ces deux phyla (Iovene et al., 2017; Kang et al., 2018). Néanmoins le large spectre de symptômes inclus dans la définition des TSA rend difficile la généralisation du terme dysbiose pour les patients atteints de cette pathologie. Il serait donc plus stratégique de faire une étude du microbiote intestinal selon le type de symptômes des patients inclus dans le spectre autistique.

L'absence de différence significative des populations bactériennes entre les contrôles sains et les patients atteints de TSA dans notre étude peut provenir de différentes raisons. Dans notre étude, nous avons recruté des patients de haut-spectre uniquement (anciennement nommé de syndrome Asperger) rendant notre population de patients atteints de TSA plus homogène. De même le large spectre de troubles digestifs (diarrhée à constipation) chez nos patients pourrait moduler différemment et spécifiquement la composition du microbiote intestinal. Cela sous-tend que même si nous n'observons pas de différence dans la composition générale du microbiote intestinal, il pourrait exister des modifications spécifiques expliquant les troubles digestifs. Une approche plus résolutive comme le séquençage par Shotgun permettrait d'observer ces modifications spécifiques du microbiote, en étudiant les différences des espèces bactériennes entre nos patients atteints de TSA et nos contrôles sains. L'étude des espèces bactériennes serait une avancée importante pour la compréhension des modifications de métabolites bactériens observés chez nos patients.

## Conclusion

---

Dans ce travail de thèse, nos travaux ont mis en évidence l'implication de la sémaphorine 3A dans les processus de maturation du SNE dans un contexte physiologique. Ainsi la sémaphorine 3A inhibe la pousse axonale et diminue la connectivité neuronale dans le SNE, des actions similaires à celles observées dans le SNC. Nous supposons que la sémaphorine 3A est sécrétée par la couche musculaire au cours du développement, restreignant l'élongation des prolongements neuronaux ectopiques dans les autres couches du tube digestif.

Nous avons également mis en évidence l'implication du microbiote intestinal, et plus particulièrement celle de ses métabolites, dans les atteintes digestives observées chez les individus ayant des troubles du spectre autistique. Nous avons montré que ces derniers étaient capables de remodeler la structure et les fonctions du tube digestif dans un modèle murin. Cependant, les mécanismes sous-jacents de ces remodelages restent à être identifiés. Parmi les métabolites du microbiote étudiés, l'acide désoxycholique est un candidat potentiel. Néanmoins son implication dans les remodelages observés reste à être précisée.

Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de mise en place du SNE et de son interaction avec le microbiote intestinal permettraient de mieux appréhender les troubles de maturation et les atteintes digestives observés dans les maladies neurodéveloppementales telles que la maladie de Hirschsprung ou les troubles du spectre autistique.



# Bibliographie

---

Abdelli, L.S., Samsam, A., and Naser, S.A. (2019). Propionic Acid Induces Gliosis and Neuroinflammation through Modulation of PTEN/AKT Pathway in Autism Spectrum Disorder. *Sci. Rep.* *9*.

Abdo, H., Derkinderen, P., Gomes, P., Chevalier, J., Aubert, P., Masson, D., Galmiche, J.-P., Vanden Berghe, P., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2010). Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 1082–1094.

Abdo, H., Mahé, M.M., Derkinderen, P., Bach-Ngohou, K., Neunlist, M., and Lardeux, B. (2012). The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. *J. Physiol.* *590*, 2739–2750.

Adams, J.B., Johansen, L.J., Powell, L.D., Quig, D., and Rubin, R.A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* *11*, 1.

Agus, A., Planchais, J., and Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* *23*, 716–724.

Akare, S., and Martinez, J.D. (2005). Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations. *Biochim. Biophys. Acta* *1735*, 59–67.

Alemi, F., Poole, D.P., Chiu, J., Schoonjans, K., Cattaruzza, F., Grider, J.R., Bunnett, N.W., and Corvera, C.U. (2013). The Receptor TGR5 Mediates the Prokinetic Actions of Intestinal Bile Acids and Is Required for Normal Defecation in Mice. *Gastroenterology* *144*, 145–154.

Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K., and Ma, T.Y. (2008). Mechanism of IL-1 $\beta$ -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Immunol.* *180*, 5653–5661.

Altay, G., Larrañaga, E., Tosi, S., Barriga, F.M., Batlle, E., Fernández-Majada, V., and Martínez, E. (2019). Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function. *Sci. Rep.* *9*.

Anagnostou, E., Zwaigenbaum, L., Szatmari, P., Fombonne, E., Fernandez, B.A., Woodbury-Smith, M., Brian, J., Bryson, S., Smith, I.M., Drmic, I., et al. (2014). Autism spectrum disorder: advances in evidence-based practice. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* *186*, 509–519.

Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* *0*, 23–29.

Anderson, R.B., Bergner, A.J., Taniguchi, M., Fujisawa, H., Forrai, A., Robb, L., and Young, H.M. (2007). Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural

crest-derived cells: A role for Sema3A, but not Sema3F. *Dev. Biol.* 305, 287–299.

Andrés-Roqueta, C., and Katsos, N. (2017). The Contribution of Grammar, Vocabulary and Theory of Mind in Pragmatic Language Competence in Children with Autistic Spectrum Disorders. *Front. Psychol.* 8, 996.

Andriezen, W.L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br. Med. J.* 2, 227–230.

Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S.V., Gewirtz, A.T., and Srinivasan, S. (2012). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology* 143, 1006-1016.e4.

Annaházi, A., Ferrier, L., Bézirard, V., Lévêque, M., Eutamène, H., Ait-Belgnaoui, A., Coëffier, M., Ducrotté, P., Róka, R., Inczefi, O., et al. (2013). Luminal Cysteine-Proteases Degrade Colonic Tight Junction Structure and Are Responsible for Abdominal Pain in Constipation-Predominant IBS. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1322–1331.

APA (1985). *Diagnostic & Statistical manual of Mental Disorders : DSM-III.* (Washington, D.C.: American Psychiatric Association).

APA (1998). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV.* (Washington, DC: American Psychiatric Association).

APA (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)* (American Psychiatric Pub).

Arora, M., Reichenberg, A., Willfors, C., Austin, C., Gennings, C., Berggren, S., Lichtenstein, P., Anckarsäter, H., Tammimies, K., and Bölte, S. (2017). Fetal and postnatal metal dysregulation in autism. *Nat. Commun.* 8, 15493.

Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.

Ashwood, P., and Van de Water, J. (2004). Is autism an autoimmune disease? *Autoimmun. Rev.* 3, 557–562.

Ashwood, P., Corbett, B.A., Kantor, A., Schulman, H., Water, J.V. de, and Amaral, D.G. (2011). In Search of Cellular Immunophenotypes in the Blood of Children with Autism. *PLOS ONE* 6, e19299.

Asperger, H. (1944). Die “autistischen Psychopathen” im Kindesalter. *Arch. Für Psychiatr. Nervenkrankh.* 76–136.

Aubé, A.-C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630–637.

Auerbach, L. (1864). Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Pathol Anat Physiol* 457–460.

Auyeung, B., Lombardo, M.V., and Baron-Cohen, S. (2013). Prenatal and postnatal hormone effects on the human brain and cognition. *Pflugers Arch.* 465, 557–571.

Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., et al. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17, 690–703.

Bagri, A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 13–31.

Bailey, A.R., Hou, H., Song, M., Obregon, D.F., Portis, S., Barger, S., Shytle, D., Stock, S., Mori, T., Sanberg, P.G., et al. (2013). GFAP expression and social deficits in transgenic mice overexpressing human sAPP $\alpha$ . *Glia* 61, 1556–1569.

Bain, C.C., and Schridde, A. (2018). Origin, Differentiation, and Function of Intestinal Macrophages. *Front. Immunol.* 9, 2733.

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43.

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19–33.

Barlow, A.J., Wallace, A.S., Thapar, N., and Burns, A.J. (2008). Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation. *Development* 135, 1681–1691.

Baron-Cohen, S. (2015). Leo Kanner, Hans Asperger, and the discovery of autism. *The Lancet* 386, 1329–1330.

Baron-Cohen, S., Leslie, A.M., and Frith, U. (1985). Does the autistic child have a “theory of mind”? *Cognition* 21, 37–46.

Barrasa, J.I., Olmo, N., Lizarbe, M.A., and Turnay, J. (2013). Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 27, 964–977.

Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G.T., and McMurdo, M.E.T. (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3575–3581.



Bayliss, W.M., and Starling, E.H. (1899). The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* *24*, 99–143.

Beloqui, A., Brayden, D.J., Artursson, P., Pr eat, V., and des Rieux, A. (2017). A human intestinal M-cell-like model for investigating particle, antigen and microorganism translocation. *Nat. Protoc.* *12*, 1387–1399.

Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K.D., et al. (2011). The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* *141*, 599–609, 609.e1-3.

Bergstr om, A., Skov, T.H., Bahl, M.I., Roager, H.M., Christensen, L.B., Ejlerskov, K.T., M lgaard, C., Michaelsen, K.F., and Licht, T.R. (2014). Establishment of Intestinal Microbiota during Early Life: a Longitudinal, Explorative Study of a Large Cohort of Danish Infants. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 2889–2900.

Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stessman, H.A., Coe, B.P., Penn, O., Witherspoon, K., Gerdt, J., Baker, C., Vulto-van Silfhout, A.T., et al. (2014). Disruptive CHD8 Mutations Define a Subtype of Autism Early in Development. *Cell* *158*, 263–276.

Berthoud, H.-R., and Neuhuber, W.L. (2000). Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci.* *85*, 1–17.

Bertrand, P.P., Kunze, W.A., Bornstein, J.C., Furness, J.B., and Smith, M.L. (1997). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol.* *273*, G422-435.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* *54*, 2325–2340.

Beutler, B., and Rietschel, E.Th. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 169–176.

Bezencon, C., le Coutre, J., and Damak, S. (2007). Taste-Signaling Proteins Are Coexpressed in Solitary Intestinal Epithelial Cells. *Chem. Senses* *32*, 41–49.

Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., et al. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PloS One* *5*, e10667.

Biedermann, L., and Rogler, G. (2015). The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur. J. Pediatr.* *174*, 151–167.

Bindels, L.B., Dewulf, E.M., and Delzenne, N.M. (2013). GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* *34*, 226–232.

Binder, H.J., and Rawlins, C.L. (1973). Effect of conjugated dihydroxy bile salts on electrolyte

transport in rat colon. *J. Clin. Invest.* 52, 1460–1466.

Bistoletti, M., Caputi, V., Baranzini, N., Marchesi, N., Filpa, V., Marsilio, I., Cerantola, S., Terova, G., Baj, A., Grimaldi, A., et al. (2019). Antibiotic treatment-induced dysbiosis differently affects BDNF and TrkB expression in the brain and in the gut of juvenile mice. *PloS One* 14, e0212856.

Black, C., Kaye, J.A., and Jick, H. (2002). Relation of childhood gastrointestinal disorders to autism: nested case-control study using data from the UK General Practice Research Database. *BMJ* 325, 419–421.

Blair, S.A., Kane, S.V., Clayburgh, D.R., and Turner, J.R. (2006). Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab. Invest.* 86, 191–201.

Blaugrund, E., Pham, T.D., Tennyson, V.M., Lo, L., Sommer, L., Anderson, D.J., and Gershon, M.D. (1996). Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Dev. Camb. Engl.* 122, 309–320.

Boesmans, W., Martens, M.A., Weltens, N., Hao, M.M., Tack, J., Cirillo, C., and Vanden Berghe, P. (2013). Imaging neuron-glia interactions in the enteric nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 7.

Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., and Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* 63, 229–241.

Boesmans, W., Hao, M.M., Fung, C., Li, Z., Van den Haute, C., Tack, J., Pachnis, V., and Vanden Berghe, P. (2019). Structurally defined signaling in neuro-glia units in the enteric nervous system. *Glia* 67, 1167–1178.

Bondurand, N., and Sham, M.H. (2013). The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev. Biol.* 382, 330–343.

Bondurand, N., and Southard-Smith, E.M. (2016). Mouse models of Hirschsprung Disease and other developmental disorders of the Enteric Nervous System: Old and new players. *Dev. Biol.* 417, 139–157.

Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N., and Pachnis, V. (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Dev. Camb. Engl.* 133, 2075–2086.

Bornstein, J.C., Costa, M., and Grider, J.R. (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 16 Suppl 1, 34–38.

Boudry, G., Morise, A., Seve, B., and LE Huërou-Luron, I. (2011). Effect of milk formula protein

content on intestinal barrier function in a porcine model of LBW neonates. *Pediatr. Res.* 69, 4–9.

von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* 11, 3.

Braun, N., Sévigny, J., Robson, S.C., Hammer, K., Hanani, M., and Zimmermann, H. (2004). Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* 45, 124–132.

Brégeon, J., Coron, E., Da Silva, A.C.C., Jaulin, J., Aubert, P., Chevalier, J., Vergnolle, N., Meurette, G., and Neunlist, M. (2016). Sacral nerve stimulation enhances early intestinal mucosal repair following mucosal injury in a pig model: Sacral nerve stimulation enhances intestinal mucosal repair. *J. Physiol.* 594, 4309–4323.

Brehmer, A. (2006). Structure of enteric neurons. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 186, 1–91.

Brehmer, A., Schrod, F., and Neuhuber, W. (1999). Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. *Anat. Embryol. (Berl.)* 200, 125–135.

Britsch, S., Goerich, D.E., Riethmacher, D., Peirano, R.I., Rossner, M., Nave, K.A., Birchmeier, C., and Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 15, 66–78.

Brochard, C., Mege, D., Bridoux, V., Meurette, G., Damon, H., Lambrescak, E., Faucheron, J., Trilling, B., Lehur, P., Wyart, V., et al. (2019). Is Sacral Nerve Modulation a Good Option for Fecal Incontinence in Men? *Neuromodulation Technol. Neural Interface* 22, 745–750.

Brookes, S.J. (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec.* 262, 58–70.

Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., et al. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11312–11319.

Brown, A.S., Sourander, A., Hinkka-Yli-Salomäki, S., McKeague, I.W., Sundvall, J., and Surcel, H.-M. (2014). Elevated maternal C-reactive protein and autism in a national birth cohort. *Mol. Psychiatry* 19, 259–264.

Brown, H.K., Hussain-Shamsy, N., Lunsby, Y., Dennis, C.-L.E., and Vigod, S.N. (2017). The Association Between Antenatal Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Autism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Psychiatry* 78, e48–e58.

Brown, I.A.M., McClain, J.L., Watson, R.E., Patel, B.A., and Gulbransen, B.D. (2016). Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 77–91.

- Bruewer, M., Utech, M., Ivanov, A.I., Hopkins, A.M., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2005). Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 923–933.
- Brun, P., and Akbarali, H.I. (2018). Culture of Neurons and Smooth Muscle Cells from the Myenteric Plexus of Adult Mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1727*, 119–125.
- Bruni, T.P. (2014). Test Review: Social Responsiveness Scale–Second Edition (SRS-2). *J. Psychoeduc. Assess.* *32*, 365–369.
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P.J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J.B., van Seuning, I., and Renes, I.B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem. J.* *420*, 211–219.
- Burgueño, J.F., Barba, A., Eyre, E., Romero, C., Neunlist, M., and Fernández, E. (2016). TLR2 and TLR9 modulate enteric nervous system inflammatory responses to lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation* *13*, 187.
- Burns, A.J., and Douarin, N.M. (1998). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 4335–4347.
- Burns, A.J., Champeval, D., and Le Douarin, N.M. (2000). Sacral Neural Crest Cells Colonise Aganglionic Hindgut in Vivo but Fail to Compensate for Lack of Enteric Ganglia. *Dev. Biol.* *219*, 30–43.
- Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* *93*, 189–201.
- Cajal, S. (1893). Sur les ganglions et plexus nerveux d'intestin. *C R Soc BiolParis* 217–223.
- Cameron, H.L., and Perdue, M.H. (2007). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *19*, 47–56.
- Camilleri, M., Vazquez-Roque, M.I., Carlson, P., Burton, D., Wong, B.S., and Zinsmeister, A.R. (2011). Association of bile acid receptor TGR5 variation and transit in health and lower functional gastrointestinal disorders: TGR5 and transit. *Neurogastroenterol. Motil.* *23*, 995-e458.
- Campbell, H.K., Maiers, J.L., and DeMali, K.A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp. Cell Res.* *358*, 39–44.
- Candido, E.P., Reeves, R., and Davie, J.R. (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* *14*, 105–113.
- Cao, X., Lin, P., Jiang, P., and Li, C. (2013). Characteristics of the gastrointestinal microbiome in

children with autism spectrum disorder: a systematic review. *Shanghai Arch. Psychiatry* 25, 342–353.

Carbone, S.E., Jovanovska, V., Nurgali, K., and Brookes, S.J.H. (2014). Human enteric neurons: morphological, electrophysiological, and neurochemical identification. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 26, 1812–1816.

Carlisi, C.O., Norman, L.J., Lukito, S.S., Radua, J., Mataix-Cols, D., and Rubia, K. (2017). Comparative Multimodal Meta-analysis of Structural and Functional Brain Abnormalities in Autism Spectrum Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder. *Biol. Psychiatry* 82, 83–102.

Casazza, A., Fazzari, P., and Tamagnone, L. (2007). Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: functional role and molecular mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 600, 90–108.

Cavallini, A., Minervini, F., Garbetta, A., Lippolis, C., Scamarcio, G., Di Franco, C., and D'Alessandro, R. (2018). High degradation and no bioavailability of artichoke miRNAs assessed using an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *Nutr. Res. N. Y. N* 60, 68–76.

CDC (2019). Data and Statistics on Autism Spectrum Disorder | CDC.

Chakrabarti, B., Dudbridge, F., Kent, L., Wheelwright, S., Hill-Cawthorne, G., Allison, C., Banerjee-Basu, S., and Baron-Cohen, S. (2009). Genes related to sex steroids, neural growth, and social-emotional behavior are associated with autistic traits, empathy, and Asperger syndrome. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* 2, 157–177.

Chalazonitis, A. (2004). Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Prog. Brain Res.* 146, 243–263.

Chang, A.D., Berges, V.A., Chung, S.J., Fridman, G.Y., Baraban, J.M., and Reti, I.M. (2016). High-Frequency Stimulation at the Subthalamic Nucleus Suppresses Excessive Self-Grooming in Autism-Like Mouse Models. *Neuropsychopharmacology* 41, 1813–1821.

Chang, P.V., Hao, L., Offermanns, S., and Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2247–2252.

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., and Rousset, M. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J. Cell Sci.* 107 ( Pt 1), 213–225.

Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.

Charlton, R.A., Jordan, S., Pierini, A., Garne, E., Neville, A.J., Hansen, A.V., Gini, R., Thayer, D., Tingay, K., Puccini, A., et al. (2015). Selective serotonin reuptake inhibitor prescribing before, during and after pregnancy: a population-based study in six European regions. *BJOG Int. J.*

Obstet. Gynaecol. *122*, 1010–1020.

Chen, J., Yu, S., Fu, Y., and Li, X. (2014). Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.

Chen, M.-H., Su, T.-P., Chen, Y.-S., Hsu, J.-W., Huang, K.-L., Chang, W.-H., Chen, T.-J., and Bai, Y.-M. (2013). Comorbidity of allergic and autoimmune diseases in patients with autism spectrum disorder: A nationwide population-based study. *Res. Autism Spectr. Disord.* *7*, 205–212.

Cheng, K., and Raufman, J.-P. (2005). Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochem. Pharmacol.* *70*, 1035–1047.

Chi, J.-H., Seo, G.S., and Lee, S.H. (2018). Oregonin inhibits inflammation and protects against barrier disruption in intestinal epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* *59*, 134–140.

Chlebowski, C., Green, J.A., Barton, M.L., and Fein, D. (2010). Using the Childhood Autism Rating Scale to Diagnose Autism Spectrum Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* *40*, 787–799.

Choi, J., Lee, S., Won, J., Jin, Y., Hong, Y., Hur, T.-Y., Kim, J.-H., Lee, S.-R., and Hong, Y. (2018). Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *PLoS ONE* *13*.

Chow, A.K., and Gulbransen, B.D. (2017). Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut1. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *312*, G145–G152.

Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M.G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A., and Fiorucci, S. (2011). The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PloS One* *6*, e25637.

Claesson, M.J., Cusack, S., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., et al. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4586–4591.

Clayburgh, D.R., Rosen, S., Witkowski, E.D., Wang, F., Blair, S., Dudek, S., Garcia, J.G.N., Alverdy, J.C., and Turner, J.R. (2004). A Differentiation-dependent Splice Variant of Myosin Light Chain Kinase, MLCK1, Regulates Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Biol. Chem.* *279*, 55506–55513.

Coelho-Aguiar, J. de M., Bon-Frauches, A.C., Gomes, A.L.T., Veríssimo, C.P., Aguiar, D.P., Matias, D., Thomasi, B.B. de M., Gomes, A.S., Brito, G.A. de C., and Moura-Neto, V. (2015). The Enteric Glia: Identity and Functions: The Enteric Glia. *Glia* *63*, 921–935.

Colegio, O.R., Itallie, C.V., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture.

Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 284, C1346–C1354.

Collado, M.C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., and Salminen, S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.* 6, 23129.

Collège national des universitaires en psychiatrie (2016). Référentiel de psychiatrie et addictologie: psychiatrie de l'adulte, psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent, addictologie .

Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E.F., Huizinga, J.D., and Ratcliffe, E.M. (2014). Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 98–107.

Conde-Agudelo, A., Rosas-Bermudez, A., and Norton, M.H. (2016). Birth Spacing and Risk of Autism and Other Neurodevelopmental Disabilities: A Systematic Review. *Pediatrics* 137.

Coquenlorge, S., Duchalais, E., Chevalier, J., Cossais, F., Rolli-Derkinderen, M., and Neunlist, M. (2014). Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system. *J. Neuroinflammation* 11, 202.

Coquenlorge, S., Van Landeghem, L., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Duchalais, E., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016). The arachidonic acid metabolite 11 $\beta$ -ProstaglandinF2 $\alpha$  controls intestinal epithelial healing: deficiency in patients with Crohn's disease. *Sci. Rep.* 6, 25203.

Coretti, L., Cristiano, C., Florio, E., Scala, G., Lama, A., Keller, S., Cuomo, M., Russo, R., Pero, R., Paciello, O., et al. (2017). Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* 7, 45356.

Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R.S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13306–13311.

Cossais, F., Durand, T., Chevalier, J., Boudaud, M., Kermarrec, L., Aubert, P., Neveu, I., Naveilhan, P., and Neunlist, M. (2016). Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 310, G941–G951.

Costa, D.V.S., Bon-Frauches, A.C., Silva, A.M.H.P., Lima-Júnior, R.C.P., Martins, C.S., Leitão, R.F.C., Freitas, G.B., Castelucci, P., Bolick, D.T., Guerrant, R.L., et al. (2019). 5-Fluorouracil Induces Enteric Neuron Death and Glial Activation During Intestinal Mucositis via a S100B-RAGE-NF $\kappa$ B-Dependent Pathway. *Sci. Rep.* 9, 665.

Costa, M., Brookes, S.J., and Hennig, G.W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 *Suppl* 4, iv15-19; discussion iv26.

Costantini, T.W., Bansal, V., Krzyzaniak, M., Putnam, J.G., Peterson, C.Y., Loomis, W.H., Wolf,

- P., Baird, A., Eliceiri, B.P., and Coimbra, R. (2010). Vagal nerve stimulation protects against burn-induced intestinal injury through activation of enteric glia cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *299*, G1308–G1318.
- Cotney, J., Muhle, R.A., Sanders, S.J., Liu, L., Willsey, A.J., Niu, W., Liu, W., Klei, L., Lei, J., Yin, J., et al. (2015). The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nat. Commun.* *6*, 6404.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C.C., and Nedergaard, M. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15735–15740.
- Crawford, J.D., Chandley, M.J., Szebeni, K., Szebeni, A., Waters, B., and Ordway, G.A. (2015). Elevated GFAP Protein in Anterior Cingulate Cortical White Matter in Males With Autism Spectrum Disorder. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* *8*, 649–657.
- Cresci, G.A., Thangaraju, M., Mellinger, J.D., Liu, K., and Ganapathy, V. (2010). Colonic Gene Expression in Conventional and Germ-Free Mice with a Focus on the Butyrate Receptor GPR109A and the Butyrate Transporter SLC5A8. *J. Gastrointest. Surg.* *14*, 449–461.
- Cristiano, C., Lama, A., Lembo, F., Mollica, M.P., Calignano, A., and Mattace Raso, G. (2018). Interplay Between Peripheral and Central Inflammation in Autism Spectrum Disorders: Possible Nutritional and Therapeutic Strategies. *Front. Physiol.* *9*, 184.
- Csárdi, G., Franks, A., Choi, D.S., Airoidi, E.M., and Drummond, D.A. (2015). Accounting for experimental noise reveals that mRNA levels, amplified by post-transcriptional processes, largely determine steady-state protein levels in yeast. *PLoS Genet.* *11*, e1005206.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., and Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* *28*, 1221–1227.
- da Cunha Franceschi, R., Nardin, P., Machado, C.V., Tortorelli, L.S., Martinez-Pereira, M.A., Zanotto, C., Gonçalves, C.-A., and Zancan, D.M. (2017). Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: Changes in GFAP and S100B protein. *Neurosci. Res.* *119*, 15–23.
- Dabek, M., Ferrier, L., Annahazi, A., Bézirard, V., Polizzi, A., Cartier, C., Leveque, M., Roka, R., Wittmann, T., Theodorou, V., et al. (2011). Intracolonic infusion of fecal supernatants from ulcerative colitis patients triggers altered permeability and inflammation in mice: Role of cathepsin G and protease-activated receptor-4. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 1409–1414.
- Davie, J.R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* *133*, 2485S–2493S.
- De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazzanetti, D.I., Cristofori, F., Guerzoni, M.E., Gobbetti, M., and Francavilla, R. (2013). Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. *PLoS ONE* *8*, e76993.



- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14691–14696.
- De Giorgio, R., Barbara, G., Furness, J.B., and Tonini, M. (2007). Novel therapeutic targets for enteric nervous system disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* *28*, 473–481.
- De Palma, G., Lynch, M.D.J., Lu, J., Dang, V.T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P.M., Pigrau Pastor, M., Sidani, S., et al. (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci. Transl. Med.* *9*.
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., Poultney, C.S., Samocha, K., Cicek, A.E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., et al. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* *515*, 209–215.
- De Vadder, F., Grasset, E., Mannerås Holm, L., Karsenty, G., Macpherson, A.J., Olofsson, L.E., and Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 6458–6463.
- Deer, B. (2011). How the case against the MMR vaccine was fixed. *BMJ* *342*, c5347.
- Delvalle, N.M., Fried, D.E., Rivera-Lopez, G., Gaudette, L., and Gulbransen, B.D. (2018). Cholinergic activation of enteric glia is a physiological mechanism that contributes to the regulation of gastrointestinal motility. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *315*, G473–G483.
- Derrien, M., Alvarez, A.-S., and de Vos, W.M. (2019). The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol.*
- Dethlefsen, L., and Relman, D.A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108 Suppl 1*, 4554–4561.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., and Relman, D.A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* *6*, e280.
- D’Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Pacifico, L., Viozzi, L., Zaccagnini, M., Cardi, E., and Giardini, O. (1996). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr.* *85*, 1076–1079.
- Devriese, S., Van den Bossche, L., Van Welden, S., Holvoet, T., Pinheiro, I., Hindryckx, P., De Vos, M., and Laukens, D. (2017). T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochem. Cell Biol.* *148*, 85–93.
- Di Ciaula, A., Garruti, G., Lunardi Baccetto, R., Molina-Molina, E., Bonfrate, L., Wang, D.Q.-

- H., and Portincasa, P. (2017). Bile Acid Physiology. *Ann. Hepatol.* *16*, s4–s14.
- Di Liddo, R., Bertalot, T., Schuster, A., Schrenk, S., Tasso, A., Zanusso, I., Conconi, M.T., and Schäfer, K.H. (2015). Anti-inflammatory activity of Wnt signaling in enteric nervous system: in vitro preliminary evidences in rat primary cultures. *J. Neuroinflammation* *12*, 23.
- Dieterich, W., Schink, M., and Zopf, Y. (2018). Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med. Sci. Basel Switz.* *6*.
- Dignass, A.U. (2001). Mechanisms and Modulation of Intestinal Epithelial Repair: Inflamm. *Bowel Dis.* *7*, 68–77.
- Dignass, A.U., and Podolsky, D.K. (1993). Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* *105*, 1323–1332.
- Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L., and Podolsky, D.K. (1994). Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J. Clin. Invest.* *94*, 376–383.
- Doenyas, C. (2018). Gut Microbiota, Inflammation, and Probiotics on Neural Development in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience*.
- Dogiel, A. (1899). Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Leipz.* 130–158.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11971–11975.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 1008–1022.
- Donato, R., Cannon, B.R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D.J., and Geczy, C.L. (2013). Functions of S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* *13*, 24–57.
- Donohoe, D.R., Collins, L.B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., and Bultman, S.J. (2012). The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol. Cell* *48*, 612–626.
- Dossa, A.Y., Escobar, O., Golden, J., Frey, M.R., Ford, H.R., and Gayer, C.P. (2016). Bile acids regulate intestinal cell proliferation by modulating EGFR and FXR signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *310*, G81-92.
- Dothel, G., Barbaro, M.R., Boudin, H., Vasina, V., Cremon, C., Gargano, L., Bellacosa, L., De Giorgio, R., Le Berre-Scoul, C., Aubert, P., et al. (2015). Nerve fiber outgrowth is increased in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *148*, 1002-1011.e4.

Druckenbrod, N.R., and Epstein, M.L. (2005). The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev. Biol.* 287, 125–133.

Duboc, H., Taché, Y., and Hofmann, A.F. (2014). The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 46, 302–312.

Duchalais, E., Guilluy, C., Nedellec, S., Touvron, M., Bessard, A., Touchefeu, Y., Bossard, C., Boudin, H., Louarn, G., Neunlist, M., et al. (2018). Colorectal Cancer Cells Adhere to and Migrate Along the Neurons of the Enteric Nervous System. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 31–49.

Duerden, E.G., Taylor, M.J., Soorya, L.V., Wang, T., Fan, J., and Anagnostou, E. (2013). Neural correlates of inhibition of socially relevant stimuli in adults with autism spectrum disorder. *Brain Res.* 1533, 80–90.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.

Eichele, D.D., and Kharbanda, K.K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 23, 6016–6029.

Ekmekci, I., von Klitzing, E., Fiebiger, U., Escher, U., Neumann, C., Bacher, P., Scheffold, A., Kühl, A.A., Bereswill, S., and Heimesaat, M.M. (2017). Immune Responses to Broad-Spectrum Antibiotic Treatment and Fecal Microbiota Transplantation in Mice. *Front. Immunol.* 8, 397.

Esnafoglu, E., Cırrık, S., Ayyıldız, S.N., Erdil, A., Ertürk, E.Y., Dağlı, A., and Noyan, T. (2017). Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. *J. Pediatr.* 188, 240–244.

Fachi, J.L., Felipe, J. de S., Pral, L.P., da Silva, B.K., Corrêa, R.O., de Andrade, M.C.P., da Fonseca, D.M., Basso, P.J., Câmara, N.O.S., de Sales E Souza, É.L., et al. (2019). Butyrate Protects Mice from *Clostridium difficile*-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell Rep.* 27, 750-761.e7.

Fagbemi, A.O., Torrente, F., Puleston, J., Lakhoo, K., James, S., and Murch, S.H. (2013). Enteric neural disruption in necrotizing enterocolitis occurs in association with myenteric glial cell CCL20 expression. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 57, 788–793.

Fan, J., Bernardi, S., Dam, N.T.V., Anagnostou, E., Gu, X., Martin, L., Park, Y., Liu, X., Kolevzon, A., Soorya, L., et al. (2012). Functional deficits of the attentional networks in autism. *Brain Behav.* 2, 647–660.

Fan, S., Weight, C.M., Luissint, A.-C., Hilgarth, R.S., Brazil, J.C., Ettel, M., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2019). Role of JAM-A tyrosine phosphorylation in epithelial barrier dysfunction during intestinal inflammation. *Mol. Biol. Cell* 30, 566–578.

- Feng, Y., Wang, Y., Wang, P., Huang, Y., and Wang, F. (2018). Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *49*, 190–205.
- Feng, Y., Huang, Y., Wang, Y., Wang, P., Song, H., and Wang, F. (2019). Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PloS One* *14*, e0218384.
- Ferguson, B.J., Dovgan, K., Takahashi, N., and Beversdorf, D.Q. (2019). The Relationship Among Gastrointestinal Symptoms, Problem Behaviors, and Internalizing Symptoms in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder. *Front. Psychiatry* *10*, 194.
- Finegold, S.M., Dowd, S.E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K.E., Wolcott, R.D., Youn, E., Summanen, P.H., Granpeesheh, D., Dixon, D., et al. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* *16*, 444–453.
- Fiore, R., and Püschel, A.W. (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *8*, s484-499.
- Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S.S., Kadzielski, S.M., Buie, T.M., Kelly, D.L., Cascella, N., and Fasano, A. (2016). Blood–brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Mol. Autism* *7*.
- Flamant, M., Aubert, P., Rolli-Derkinderen, M., Bourreille, A., Neunlist, M.R., Mahé, M.M., Meurette, G., Marteyn, B., Savidge, T., Galmiche, J.P., et al. (2011). Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* *60*, 473–484.
- Fletcher, E.L., Clark, M.J., and Furness, J.B. (2002). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res.* *308*, 339–346.
- Fontao, L., Stutzmann, J., Gendry, P., and Launay, J.F. (1999). Regulation of the Type II Hemidesmosomal Plaque Assembly in Intestinal Epithelial Cells. *Exp. Cell Res.* *250*, 298–312.
- Foong, J.P.P., Hirst, C.S., Hao, M.M., McKeown, S.J., Boesmans, W., Young, H.M., Bornstein, J.C., and Vanden Berghe, P. (2015). Changes in Nicotinic Neurotransmission during Enteric Nervous System Development. *J. Neurosci.* *35*, 7106–7115.
- Forsgård, R.A., Korpela, R., Stenman, L.K., Osterlund, P., and Holma, R. (2014). Deoxycholic acid induced changes in electrophysiological parameters and macromolecular permeability in murine small intestine with and without functional enteric nervous system plexuses. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *26*, 1179–1187.
- Fraher, M.H., O’Toole, P.W., and Quigley, E.M.M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 312–322.

- Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13780–13785.
- Fried, D.E., Watson, R.E., Robson, S.C., and Gulbransen, B.D. (2017). Ammonia modifies enteric neuromuscular transmission through glial  $\gamma$ -aminobutyric acid signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *313*, G570–G580.
- Friedmann, H.C. (2014). Escherich and Escherichia. *EcoSal Plus* *6*.
- Fröhlich, H., Kollmeyer, M.L., Linz, V.C., Stuhlinger, M., Groneberg, D., Reigl, A., Zizer, E., Friebe, A., Niesler, B., and Rappold, G. (2019). Gastrointestinal dysfunction in autism displayed by altered motility and achalasia in *Foxp1*<sup>+/-</sup> mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 22237–22245.
- Frye, R.E., Delhey, L., Slattery, J., Tippett, M., Wynne, R., Rose, S., Kahler, S.G., Bennuri, S.C., Melnyk, S., Sequeira, J.M., et al. (2016). Blocking and Binding Folate Receptor Alpha Autoantibodies Identify Novel Autism Spectrum Disorder Subgroups. *Front. Neurosci.* *10*, 80.
- Fu, M., Lui, V.C.H., Sham, M.H., Cheung, A.N.Y., and Tam, P.K.H. (2003). HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *228*, 1–10.
- Fu, M., Tam, P.K.H., Sham, M.H., and Lui, V.C.H. (2004). Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anat. Embryol. (Berl.)* *208*, 33–41.
- Fujiwara, N., Miyahara, K., Nakazawa-Tanaka, N., Akazawa, C., and Yamataka, A. (2018). Increased expression of Semaphorin 3A in the endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung disease. *J. Pediatr. Surg.* *53*, 326–329.
- Fukata, M., and Arditì, M. (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* *6*, 451–463.
- Fulceri, F., Morelli, M., Santocchi, E., Cena, H., Del Bianco, T., Narzisi, A., Calderoni, S., and Muratori, F. (2016). Gastrointestinal symptoms and behavioral problems in preschoolers with Autism Spectrum Disorder. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* *48*, 248–254.
- Furness, J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* *81*, 87–96.
- Furness, J.B. (2006). *The enteric nervous system* (Malden, Mass.: Blackwell Pub.).
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 286–294.

- Furness, J.B., Kunze, W.A., Bertrand, P.P., Clerc, N., and Bornstein, J.C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog. Neurobiol.* *54*, 1–18.
- Furness, J.B., Alex, G., Clark, M.J., and Lal, V.V. (2003). Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* *272*, 475–483.
- Furness, J.B., Jones, C., Nurgali, K., and Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* *72*, 143–164.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446–450.
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* *111*, 69–97.
- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* *6*, 425–436.
- Gabella, G., and Trigg, P. (1984). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J. Neurocytol.* *13*, 49–71.
- Gabriele, S., Sacco, R., Altieri, L., Neri, C., Urbani, A., Bravaccio, C., Riccio, M.P., Iovene, M.R., Bombace, F., De Magistris, L., et al. (2016). Slow intestinal transit contributes to elevate urinary p-cresol level in Italian autistic children. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* *9*, 752–759.
- Gallagher, C., McCarthy, F.P., Ryan, R.M., and Khashan, A.S. (2018). Maternal Alcohol Consumption During Pregnancy and the Risk of Autism Spectrum Disorders in Offspring: A Retrospective Analysis of the Millennium Cohort Study. *J. Autism Dev. Disord.* *48*, 3773–3782.
- Gallego, D., Malagelada, C., Accarino, A., Gori, A., Malagelada, J.R., Azpiroz, F., Giorgio, R.D., and Jimenez, M. (2018). Functional neuromuscular impairment in severe intestinal dysmotility. *Neurogastroenterol. Motil.* *30*, e13458.
- Ganapathy, V., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Martin, P.M., and Singh, N. (2013). Transporters and receptors for short-chain fatty acids as the molecular link between colonic bacteria and the host. *Curr. Opin. Pharmacol.* *13*, 869–874.
- Gao, X., Pujos-Guillot, E., Martin, J.-F., Galan, P., Juste, C., Jia, W., and Sebedio, J.-L. (2009). Metabolite analysis of human fecal water by gas chromatography/mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization. *Anal. Biochem.* *393*, 163–175.
- Gardner, R.M., Lee, B.K., Magnusson, C., Rai, D., Frisell, T., Karlsson, H., Idring, S., and Dalman, C. (2015). Maternal body mass index during early pregnancy, gestational weight gain, and risk of autism spectrum disorders: Results from a Swedish total population and discordant sibling study. *Int. J. Epidemiol.* *44*, 870–883.

Garrod, D., and Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 572–587.

Gaudier, E., Rival, M., Buisine, M.-P., Robineau, I., and Hoebler, C. (2009). Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol. Res.* 58, 111–119.

Gentile, S. (2014). Risks of neurobehavioral teratogenicity associated with prenatal exposure to valproate monotherapy: a systematic review with regulatory repercussions. *CNS Spectr.* 19, 305–315.

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230.

Gershon, M.D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 101–109.

Gershon, M.D. (1998). *The second brain: the scientific basis of gut instinct and a groundbreaking new understanding of nervous disorders of the stomach and intestine* (New York, NY: HarperCollinsPubl).

Getz, K.D., Anderka, M.T., Werler, M.M., and Jick, S.S. (2016). Maternal Pre-pregnancy Body Mass Index and Autism Spectrum Disorder among Offspring: A Population-Based Case-Control Study. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 30, 479–487.

Ghia, J.-E., Blennerhassett, P., El-Sharkawy, R.T., and Collins, S.M. (2007). The protective effect of the vagus nerve in a murine model of chronic relapsing colitis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G711–G718.

Gianino, S., Grider, J.R., Cresswell, J., Enomoto, H., and Heuckeroth, R.O. (2003). GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Dev. Camb. Engl.* 130, 2187–2198.

Golden, C.E., Buxbaum, J.D., and De Rubeis, S. (2018). Disrupted circuits in mouse models of autism spectrum disorder and intellectual disability. *Curr. Opin. Neurobiol.* 48, 106–112.

Goldstein, A.M., Brewer, K.C., Doyle, A.M., Nagy, N., and Roberts, D.J. (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech. Dev.* 122, 821–833.

Golubeva, A.V., Joyce, S.A., Moloney, G., Burokas, A., Sherwin, E., Arboleya, S., Flynn, I., Khochanskiy, D., Moya-Pérez, A., Peterson, V., et al. (2017). Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism. *EBioMedicine* 24, 166–178.

González-Regueiro, J.A., Moreno-Castañeda, L., Uribe, M., and Chávez-Tapia, N.C. (2017). The

Role of Bile Acids in Glucose Metabolism and Their Relation with Diabetes. *Ann. Hepatol.* *16*, 16–21.

Gordon, S.J., Kinsey, M.D., Magen, J.S., Joseph, R.E., and Kowlessar, O.D. (1979). Structure of bile acids associated with secretion in the rat cecum. *Gastroenterology* *77*, 38–44.

Gorrindo, P., Williams, K.C., Lee, E.B., Walker, L.S., McGrew, S.G., and Levitt, P. (2012). Gastrointestinal dysfunction in autism: parental report, clinical evaluation, and associated factors. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* *5*, 101–108.

Goshima, Y., Yamashita, N., Nakamura, F., and Sasaki, Y. (2016). Regulation of dendritic development by semaphorin 3A through novel intracellular remote signaling. *Cell Adhes. Migr.* *10*, 627–640.

Grès, M.C., Julian, B., Bourrié, M., Meunier, V., Roques, C., Berger, M., Boulenc, X., Berger, Y., and Fabre, G. (1998). Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm. Res.* *15*, 726–733.

Gribble, F.M., and Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* *78*, 277–299.

Gribble, F.M., and Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* *15*, 226–237.

Grubišić, V., and Gulbransen, B.D. (2017). Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J. Physiol.* *595*, 557–570.

Grubišić, V., and Parpura, V. (2015). The second brain in autism spectrum disorder: could connexin 43 expressed in enteric glial cells play a role? *Front. Cell. Neurosci.* *9*, 242.

Grubišić, V., and Parpura, V. (2017). Two modes of enteric gliotransmission differentially affect gut physiology. *Glia* *65*, 699–711.

Grubišić, V., Kennedy, A.J., Sweatt, J.D., and Parpura, V. (2015). Pitt-Hopkins Mouse Model has Altered Particular Gastrointestinal Transits In Vivo. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* *8*, 629–633.

Grubišić, V., Verkhatsky, A., Zorec, R., and Parpura, V. (2018). Enteric glia regulate gut motility in health and disease. *Brain Res. Bull.* *136*, 109–117.

Guedia, J., Brun, P., Bhave, S., Fitting, S., Kang, M., Dewey, W.L., Hauser, K.F., and Akbarali, H.I. (2016). HIV-1 Tat exacerbates lipopolysaccharide-induced cytokine release via TLR4 signaling in the enteric nervous system. *Sci. Rep.* *6*, 31203.

Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2009). Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* *136*, 1349–1358.



- Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 625–632.
- Gulbransen, B.D., Bashashati, M., Hirota, S.A., Gui, X., Roberts, J.A., MacDonald, J.A., Muruve, D.A., McKay, D.M., Beck, P.L., Mawe, G.M., et al. (2012). Activation of neuronal P2X7 receptor-Pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat. Med.* 18, 600–604.
- Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345–357.
- Gunadi, Makhmudi, A., Agustriani, N., and Rochadi (2016). Effects of SEMA3 polymorphisms in Hirschsprung disease patients. *Pediatr. Surg. Int.* 32, 1025–1028.
- Günzel, D., and Yu, A.S.L. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol. Rev.* 93, 525–569.
- Guo, C., Chen, W.-D., and Wang, Y.-D. (2016). TGR5, Not Only a Metabolic Regulator. *Front. Physiol.* 7.
- Ha, S., Sohn, I.-J., Kim, N., Sim, H.J., and Cheon, K.-A. (2015). Characteristics of Brains in Autism Spectrum Disorder: Structure, Function and Connectivity across the Lifespan. *Exp. Neurobiol.* 24, 273.
- Hachem, S., Aguirre, A., Vives, V., Marks, A., Gallo, V., and Legraverend, C. (2005). Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia* 51, 81–97.
- Hällgren, A., Flemström, G., and Nylander, O. (1998). Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am. J. Physiol.* 275, G95-103.
- Han, X., Song, H., Wang, Y., Sheng, Y., and Chen, J. (2015). Sodium butyrate protects the intestinal barrier function in peritonitic mice. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 4000–4007.
- Hanani, M., and Reichenbach, A. (1994). Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 278, 153–160.
- Hanani, M., Francke, M., Härtig, W., Grosche, J., Reichenbach, A., and Pannicke, T. (2000). Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G644-651.
- Hansebout, C.R., Su, C., Reddy, K., Zhang, D., Jiang, C., Rathbone, M.P., and Jiang, S. (2012). Enteric glia mediate neuronal outgrowth through release of neurotrophic factors. *Neural Regen. Res.* 7, 2165–2175.
- Hansen, M.B. (2003). The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 105–113.
- Hao, M.M., Bornstein, J.C., Vanden Berghe, P., Lomax, A.E., Young, H.M., and Foong, J.P.P. (2013). The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous

system. *Dev. Biol.* 382, 365–374.

Hao, M.M., Foong, J.P.P., Bornstein, J.C., Li, Z.L., Vanden Berghe, P., and Boesmans, W. (2016). Enteric nervous system assembly: Functional integration within the developing gut. *Dev. Biol.* 417, 168–181.

Hayes, C.L., Dong, J., Galipeau, H.J., Jury, J., McCarville, J., Huang, X., Wang, X.-Y., Naidoo, A., Anbazhagan, A.N., Libertucci, J., et al. (2018). Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Sci. Rep.* 8, 14184.

He, S., Guo, Y., Zhao, J., Xu, X., Song, J., Wang, N., and Liu, Q. (2018). Ferulic acid protects against heat stress-induced intestinal epithelial barrier dysfunction in IEC-6 cells via the PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Int. J. Hyperthermia* 35, 112–121.

Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2006). Expression profiling the developing mammalian enteric nervous system identifies marker and candidate Hirschsprung disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6919–6924.

Heberling, C.A., Dhurjati, P.S., and Sasser, M. (2013). Hypothesis for a systems connectivity model of Autism Spectrum Disorder pathogenesis: links to gut bacteria, oxidative stress, and intestinal permeability. *Med. Hypotheses* 80, 264–270.

Hering, N.A., Andres, S., Fromm, A., van Tol, E.A., Amasheh, M., Mankertz, J., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2011). Transforming Growth Factor- $\beta$ , a Whey Protein Component, Strengthens the Intestinal Barrier by Upregulating Claudin-4 in HT-29/B6 Cells. *J. Nutr.* 141, 783–789.

Heuckeroth, R.O., Lampe, P.A., Johnson, E.M., and Milbrandt, J. (1998). Neurturin and GDNF Promote Proliferation and Survival of Enteric Neuron and Glial Progenitors in Vitro. *Dev. Biol.* 200, 116–129.

Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J.F., and Morgat, J.L. (1982). Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 242, G558–G564.

Hiergeist, A., Gläsner, J., Reischl, U., and Gessner, A. (2015). Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR J.* 56, 228–240.

Hildebrand, S.V., and Hill, T. (1994). Interaction of gentamycin and atracurium in anaesthetised horses. *Equine Vet. J.* 26, 209–211.

Hirst, G.D., Holman, M.E., and Spence, I. (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J. Physiol.* 236, 303–326.

Hoehner, J.C., Wester, T., Pählman, S., and Olsen, L. (1996). Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* 110, 756–767.

Hoff, S., Zeller, F., Weyhern, C.W.H. von, Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., and Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system

with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* *509*, 356–371.

Holiga, Š., Hipp, J.F., Chatham, C.H., Garces, P., Spooren, W., D’Ardhuy, X.L., Bertolino, A., Bouquet, C., Buitelaar, J.K., Bours, C., et al. (2019). Patients with autism spectrum disorders display reproducible functional connectivity alterations. *Sci. Transl. Med.* *11*.

Holly, M.K., and Smith, J.G. (2018). Paneth Cells during Viral Infection and Pathogenesis. *Viruses* *10*.

Hopkins, D.A., Bieger, D., deVente, J., and Steinbusch, W.M. (1996). Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog. Brain Res.* *107*, 79–96.

Horvath, K., and Perman, J.A. (2002). Autism and gastrointestinal symptoms. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *4*, 251–258.

Hosie, S., Ellis, M., Swaminathan, M., Ramalhosa, F., Seger, G.O., Balasuriya, G.K., Gillberg, C., Råstam, M., Churilov, L., McKeown, S.J., et al. (2019). Gastrointestinal dysfunction in patients and mice expressing the autism-associated R451C mutation in neuroligin-3. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* *12*, 1043–1056.

Howe, K.L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., and McKay, D.M. (2005). Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced increased permeability. *Am. J. Pathol.* *167*, 1587–1597.

Hoyle, C.H., and Burnstock, G. (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J. Anat.* *166*, 7–22.

Hsiao, E.Y. (2014). Gastrointestinal issues in autism spectrum disorder. *Harv. Rev. Psychiatry* *22*, 104–111.

Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., et al. (2013). Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell* *155*, 1451–1463.

Hu, M.D., Ethridge, A.D., Lipstein, R., Kumar, S., Wang, Y., Jabri, B., Turner, J.R., and Edelblum, K.L. (2018). Epithelial IL-15 Is a Critical Regulator of  $\gamma\delta$  Intraepithelial Lymphocyte Motility within the Intestinal Mucosa. *J. Immunol.* *201*, 747–756.

Hughes, H.K., Rose, D., and Ashwood, P. (2018). The Gut Microbiota and Dysbiosis in Autism Spectrum Disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *18*, 81.

Huizinga, J.D., and Lammers, W.J.E.P. (2009). Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *296*, G1-8.

Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Klüppel, M., Malysz, J., Mikkelsen, H.B., and Bernstein, A. (1995). *W/kit* gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* *373*, 347–349.

- Humenick, A., Chen, B.N., Lauder, C.I.W., Wattchow, D.A., Zagorodnyuk, V.P., Dinning, P.G., Spencer, N.J., Costa, M., and Brookes, S.J.H. (2019). Characterization of projections of longitudinal muscle motor neurons in human colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *31*, e13685.
- Hurst, N.R., Kendig, D.M., Murthy, K.S., and Grider, J.R. (2014). The short chain fatty acids, butyrate and propionate, have differential effects on the motility of the guinea pig colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *26*, 1586–1596.
- Hussey, S., Wall, R., Gruffman, E., O’Sullivan, L., Ryan, C.A., Murphy, B., Fitzgerald, G., Stanton, C., and Ross, R.P. (2011). Parenteral antibiotics reduce bifidobacteria colonization and diversity in neonates. *Int. J. Microbiol.* *2011*.
- Ibiza, S., García-Cassani, B., Ribeiro, H., Carvalho, T., Almeida, L., Marques, R., Misic, A.M., Bartow-McKenney, C., Larson, D.M., Pavan, W.J., et al. (2016). Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* *535*, 440–443.
- Ibrahim, S.H., Voigt, R.G., Katusic, S.K., Weaver, A.L., and Barbaresi, W.J. (2009). Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics* *124*, 680–686.
- Iden, S., Misselwitz, S., Peddibhotla, S.S.D., Tuncay, H., Rehder, D., Gerke, V., Robenek, H., Suzuki, A., and Ebnet, K. (2012). aPKC phosphorylates JAM-A at Ser285 to promote cell contact maturation and tight junction formation. *J. Cell Biol.* *196*, 623–639.
- Iovene, M.R., Bombace, F., Maresca, R., Sapone, A., Iardino, P., Picardi, A., Marotta, R., Schiraldi, C., Siniscalco, D., Serra, N., et al. (2017). Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders. *Mycopathologia* *182*, 349–363.
- Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., and Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS One* *5*, e9836.
- Jakobsson, H.E., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G.C., and Johansson, M.E.V. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep.* *16*, 164–177.
- James, D.M., Kozol, R.A., Kajiwara, Y., Wahl, A.L., Storrs, E.C., Buxbaum, J.D., Klein, M., Moshiree, B., and Dallman, J.E. (2019). Intestinal dysmotility in a zebrafish (*Danio rerio*) *shank3a;shank3b* mutant model of autism. *Mol. Autism* *10*, 3.
- Jeffery, I.B., O’Toole, P.W., Öhman, L., Claesson, M.J., Deane, J., Quigley, E.M.M., and Simrén, M. (2012). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* *61*, 997–1006.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., and Jansson, J.K. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiol. Read. Engl.* *156*, 3216–3223.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286, 736–737.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1983). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 3, 2206–2218.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1985). Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J. Neuroimmunol.* 8, 377–393.

Jessen, K.R., Morgan, L., Stewart, H.J., and Mirsky, R. (1990). Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Dev. Camb. Engl.* 109, 91–103.

Jiang, Q., Arnold, S., Heanue, T., Kilambi, K.P., Doan, B., Kapoor, A., Ling, A.Y., Sosa, M.X., Guy, M., Jiang, Q., et al. (2015). Functional Loss of Semaphorin 3C and/or Semaphorin 3D and Their Epistatic Interaction with Ret Are Critical to Hirschsprung Disease Liability. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 581–596.

Jiang, Y., Liu, M., and Gershon, M.D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev. Biol.* 258, 364–384.

Jiménez, E., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L., and Rodríguez, J.M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159, 187–193.

Jin, S., Martinelli, D.C., Zheng, X., Tessier-Lavigne, M., and Fan, C.-M. (2015). Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E73–E80.

Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 639–649.

Johnson, C.P., Myers, S.M., and American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities (2007). Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 120, 1183–1215.

Johnson, E.L., Heaver, S.L., Walters, W.A., and Ley, R.E. (2017). Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 95, 1–8.

Johnstone, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 287–299.

Jones, H.F., Butler, R.N., and Brooks, D.A. (2011). Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G202–G206.

Jongbloets, B.C., and Pasterkamp, R.J. (2014). Semaphorin signalling during development. *Dev. Camb. Engl.* 141, 3292–3297.

Jónsson, H., Sulem, P., Kehr, B., Kristmundsdóttir, S., Zink, F., Hjartarson, E., Hardarson, M.T.,

Hjorleifsson, K.E., Eggertsson, H.P., Gudjonsson, S.A., et al. (2017). Parental influence on human germline de novo mutations in 1,548 trios from Iceland. *Nature* 549, 519–522.

Józefczuk, J., Konopka, E., Bierła, J.B., Trojanowska, I., Sowińska, A., Czarnecki, R., Sobol, L., Józefczuk, P., Surdy, W., and Cukrowska, B. (2018). The Occurrence of Antibodies Against Gluten in Children with Autism Spectrum Disorders Does Not Correlate with Serological Markers of Impaired Intestinal Permeability. *J. Med. Food* 21, 181–187.

Jung, Y., Lee, A.M., McKee, S.A., and Picciotto, M.R. (2017). Maternal smoking and autism spectrum disorder: meta-analysis with population smoking metrics as moderators. *Sci. Rep.* 7, 4315.

Kabouridis, P.S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Pettersson, S., and Pachnis, V. (2015). Microbiota Controls the Homeostasis of Glial Cells in the Gut Lamina Propria. *Neuron* 85, 289–295.

Kaiko, G.E., Ryu, S.H., Koues, O.I., Collins, P.L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E.J., Pearce, E.L., Oltz, E.M., and Stappenbeck, T.S. (2016). The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* 165, 1708–1720.

Kaji, I., Iwanaga, T., Watanabe, M., Guth, P.H., Engel, E., Kaunitz, J.D., and Akiba, Y. (2015). SCFA transport in rat duodenum. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 308, G188–G197.

Kaji, I., Akiba, Y., Konno, K., Watanabe, M., Kimura, S., Iwanaga, T., Kuri, A., Iwamoto, K.-I., Kuwahara, A., and Kaunitz, J.D. (2016). Neural FFA3 activation inversely regulates anion secretion evoked by nicotinic ACh receptor activation in rat proximal colon. *J. Physiol.* 594, 3339–3352.

Kalkbrenner, A.E., Schmidt, R.J., and Penlesky, A.C. (2014). Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 44, 277–318.

Kang, B.N., Ha, S.G., Bahaie, N.S., Hosseinkhani, M.R., Ge, X.N., Blumenthal, M.N., Rao, S.P., and Sriramarao, P. (2013a). Regulation of Serotonin-Induced Trafficking and Migration of Eosinophils. *PLoS ONE* 8, e54840.

Kang, D.-W., Park, J.G., Ilhan, Z.E., Wallstrom, G., Labaer, J., Adams, J.B., and Krajmalnik-Brown, R. (2013b). Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PloS One* 8, e68322.

Kang, D.-W., Adams, J.B., Gregory, A.C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., Khoruts, A., Geis, E., Maldonado, J., McDonough-Means, S., et al. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 5, 10.

Kang, D.-W., Ilhan, Z.E., Isern, N.G., Hoyt, D.W., Howsmon, D.P., Shaffer, M., Lozupone, C.A., Hahn, J., Adams, J.B., and Krajmalnik-Brown, R. (2018). Differences in fecal microbial

- metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe* 49, 121–131.
- Kang, D.-W., Adams, J.B., Coleman, D.M., Pollard, E.L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Caporaso, J.G., and Krajmalnik-Brown, R. (2019). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci. Rep.* 9, 5821.
- Kang, V., Wagner, G.C., and Ming, X. (2014). Gastrointestinal dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* 7, 501–506.
- Kanner, L. (1943). Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nerv. Child* 217–250.
- Kapur, R.P. (2000). Colonization of the Murine Hindgut by Sacral Crest-Derived Neural Precursors: Experimental Support for an Evolutionarily Conserved Model. *Dev. Biol.* 227, 146–155.
- Kapur, R.P. (2009). Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin. Pediatr. Surg.* 18, 212–223.
- Kapur, R.P., Yost, C., and Palmiter, R.D. (1992). A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Dev. Camb. Engl.* 116, 167–175.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., et al. (2003). A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *J. Biol. Chem.* 278, 9435–9440.
- Keating, N., Mroz, M.S., Scharl, M.M., Marsh, C., Ferguson, G., Hofmann, A.F., and Keely, S.J. (2009). Physiological concentrations of bile acids down-regulate agonist induced secretion in colonic epithelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2293–2303.
- Kelly, C.J., Zheng, L., Campbell, E.L., Saeedi, B., Scholz, C.C., Bayless, A.J., Wilson, K.E., Glover, L.E., Kominsky, D.J., Magnuson, A., et al. (2015). Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe* 17, 662–671.
- Kennedy, E.A., King, K.Y., and Baldrige, M.T. (2018). Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Front. Physiol.* 9, 1534.
- Kenny, L., Hattersley, C., Molins, B., Buckley, C., Povey, C., and Pellicano, E. (2016). Which terms should be used to describe autism? Perspectives from the UK autism community. *Autism Int. J. Res. Pract.* 20, 442–462.
- Kermarrec, L., Durand, T., Neunlist, M., Naveilhan, P., and Neveu, I. (2016). Enteric glial cells have specific immunosuppressive properties. *J. Neuroimmunol.* 295–296, 79–83.
- Kim, B.-S., Kim, J.N., and Cerniglia, C.E. (2011a). *In Vitro* Culture Conditions for Maintaining a Complex Population of Human Gastrointestinal Tract Microbiota. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 1–10.

- Kim, D.Y., Hong, G.U., and Ro, J.Y. (2011b). Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L. *J. Neuroinflammation* 8, 25.
- Kim, H.J., Leeds, P., and Chuang, D.-M. (2009). The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J. Neurochem.* 110, 1226–1240.
- Kim, J.-W., Choi, C.S., Kim, K.C., Park, J.H., Seung, H., Joo, S.H., Yang, S.M., Shin, C.Y., and Park, S.H. (2013). Gastrointestinal tract abnormalities induced by prenatal valproic Acid exposure in rat offspring. *Toxicol. Res.* 29, 173–179.
- Kimball, B.C., and Mulholland, M.W. (1996). Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. *J. Neurochem.* 66, 604–612.
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118, 1001–1011.
- Kirchgessner, A.L., Tamir, H., and Gershon, M.D. (1992). Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 235–248.
- Klingelhoefer, L., and Reichmann, H. (2015). Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 625–636.
- Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., and Ley, R.E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4578–4585.
- Kong, A., Frigge, M.L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., et al. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471–475.
- Krstic, D., Madhusudan, A., Doehner, J., Vogel, P., Notter, T., Imhof, C., Manalastas, A., Hilfiker, M., Pfister, S., Schwerdel, C., et al. (2012). Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J. Neuroinflammation* 9, 151.
- Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2009). Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Mol. Biol. Cell* 20, 3713–3724.
- Krumm, N., Turner, T.N., Baker, C., Vives, L., Mohajeri, K., Witherspoon, K., Raja, A., Coe, B.P., Stessman, H.A., He, Z.-X., et al. (2015). Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nat. Genet.* 47, 582–588.
- Kunze, W.A., Clerc, N., Furness, J.B., and Gola, M. (2000). The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation. *J. Physiol.* 526 Pt 2, 375–385.
- Kushak, R.I., Buie, T.M., Murray, K.F., Newburg, D.S., Chen, C., Nestoridi, E., and Winter, H.S.



(2016). Evaluation of intestinal function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *62*, 687–691.

Kushak, R.I., Winter, H.S., Buie, T.M., Cox, S.B., Phillips, C.D., and Ward, N.L. (2017). Analysis of the Duodenal Microbiome in Autistic Individuals: Association With Carbohydrate Digestion. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *64*, e110–e116.

Lacy, E.R. (1988). Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Gastroenterol.* *10 Suppl 1*, S72-77.

Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., et al. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 1185–1193.

Lai, M.-C., Lombardo, M.V., and Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *Lancet Lond. Engl.* *383*, 896–910.

Lake, J.I., and Heuckeroth, R.O. (2013). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *305*, G1–G24.

Langley, J. (1921). *The autonomic nervous system, part I.* (Cambridge, [Eng.] : W. Heffer).

Laranjeira, C., and Pachnis, V. (2009). Enteric nervous system development: Recent progress and future challenges. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* *151*, 61–69.

Lauder, A.P., Roche, A.M., Sherrill-Mix, S., Bailey, A., Laughlin, A.L., Bittinger, K., Leite, R., Elovitz, M.A., Parry, S., and Bushman, F.D. (2016). Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome* *4*, 29.

Laursen, M.F., Zachariassen, G., Bahl, M.I., Bergström, A., Høst, A., Michaelsen, K.F., and Licht, T.R. (2015). Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC Microbiol.* *15*, 154.

Lavoie, E.G., Gulbransen, B.D., Martín-Satué, M., Aliagas, E., Sharkey, K.A., and Sévigny, J. (2011). Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G608-620.

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

Le Douarin, N.M., and Teillet, M.A. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *30*, 31–48.

Le Loupp, A.-G., Bach-Ngohou, K., Bourreille, A., Boudin, H., Rolli-Derkinderen, M., Denis, M.G., Neunlist, M., and Masson, D. (2015). Activation of the prostaglandin D2 metabolic

pathway in Crohn's disease: involvement of the enteric nervous system. *BMC Gastroenterol.* *15*, 112.

Lee, B.K., Magnusson, C., Gardner, R.M., Blomström, Å., Newschaffer, C.J., Burstyn, I., Karlsson, H., and Dalman, C. (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* *44*, 100–105.

Lee, C., Kim, B.G., Kim, J.H., Chun, J., Im, J.P., and Kim, J.S. (2017a). Sodium butyrate inhibits the NF-kappa B signaling pathway and histone deacetylation, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner. *Int. Immunopharmacol.* *51*, 47–56.

Lee, H.Y., Crawley, S., Hokari, R., Kwon, S., and Kim, Y.S. (2010). Bile acid regulates MUC2 transcription in colon cancer cells via positive EGFR/PKC/Ras/ERK/CREB, PI3K/Akt/IkappaB/NF-kappaB and p38/MSK1/CREB pathways and negative JNK/c-Jun/AP-1 pathway. *Int. J. Oncol.* *36*, 941–953.

Lee, Y., Park, J.-Y., Lee, E.-H., Yang, J., Jeong, B.-R., Kim, Y.-K., Seoh, J.-Y., Lee, S., Han, P.-L., and Kim, E.-J. (2017b). Rapid Assessment of Microbiota Changes in Individuals with Autism Spectrum Disorder Using Bacteria-derived Membrane Vesicles in Urine. *Exp. Neurobiol.* *26*, 307–317.

Leembruggen, A.J.L., Balasuriya, G.K., Zhang, J., Schokman, S., Swiderski, K., Bornstein, J.C., Nithianantharajah, J., and Hill-Yardin, E.L. (2019). Colonic dilation and altered ex vivo gastrointestinal motility in the neuroligin-3 knockout mouse. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.*

Leon-Ponte, M., Ahern, G.P., and O'Connell, P.J. (2007). Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood* *109*, 3139–3146.

Li, T., and Chiang, J.Y.L. (2014). Bile Acid Signaling in Metabolic Disease and Drug Therapy. *Pharmacol. Rev.* *66*, 948–983.

Li, L., Ma, L., and Fu, P. (2017). Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and kidney diseases. *Drug Des. Devel. Ther. Volume 11*, 3531–3542.

Li, Q., Michel, K., Annahazi, A., Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Zeller, F., Komorowski, L., Stöcker, W., Beyak, M.J., Grundy, D., et al. (2016a). Anti-Hu antibodies activate enteric and sensory neurons. *Sci. Rep.* *6*, 38216.

Li, S., Chen, X., Zhou, L., and Wang, B.-M. (2015). Farnesoid X receptor signal is involved in deoxycholic acid-induced intestinal metaplasia of normal human gastric epithelial cells. *Oncol. Rep.* *34*, 2674–2682.

Li, Z., Zhang, X., Zhou, H., Liu, W., and Li, J. (2016b). Exogenous S-nitrosoglutathione attenuates inflammatory response and intestinal epithelial barrier injury in endotoxemic rats. *J. Trauma Acute Care Surg.* *80*, 977–984.

Li, Z., Quan, G., Jiang, X., Yang, Y., Ding, X., Zhang, D., Wang, X., Hardwidge, P.R., Ren, W., and Zhu, G. (2018). Effects of Metabolites Derived From Gut Microbiota and Hosts on Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 314.

Liang, C., Wang, K.-Y., Yu, Z., and Xu, B. (2016). Development of a novel mouse constipation model. *World J. Gastroenterol.* 22, 2799–2810.

Lievin-Le Moal, V., and Servin, A.L. (2006). The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 315–337.

Lin, Z., Gao, N., Hu, H.-Z., Liu, S., Gao, C., Kim, G., Ren, J., Xia, Y., Peck, O.C., and Wood, J.D. (2002). Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 14, 197–204.

Liu, Z., Jin, Y.-Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., Wu, W., Qi, Z., and Shen, Z. (2015). Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PloS One* 10, e0123278.

Lomax, A.E., Bertrand, P.P., and Furness, J.B. (2001). Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon. *Neuroscience* 103, 245–255.

Lombardo, M.V., Ashwin, E., Auyeung, B., Chakrabarti, B., Lai, M.-C., Taylor, K., Hackett, G., Bullmore, E.T., and Baron-Cohen, S. (2012). Fetal programming effects of testosterone on the reward system and behavioral approach tendencies in humans. *Biol. Psychiatry* 72, 839–847.

Long, X., Li, M., Li, L.-X., Sun, Y.-Y., Zhang, W.-X., Zhao, D.-Y., and Li, Y.-Q. (2018). Butyrate promotes visceral hypersensitivity in an IBS-like model via enteric glial cell-derived nerve growth factor. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 30, e13227.

Lord, C., Rutter, M., Goode, S., Heemsbergen, J., Jordan, H., Mawhood, L., and Schopler, E. (1989). Autism diagnostic observation schedule: A standardized observation of communicative and social behavior. *J. Autism Dev. Disord.* 19, 185–212.

Lord, C., Rutter, M., and Le Couteur, A. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 24, 659–685.

Lord, C., Risi, S., Lambrecht, L., Cook, E.H., Leventhal, B.L., DiLavore, P.C., Pickles, A., and Rutter, M. (2000). The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *J. Autism Dev. Disord.* 30, 205–223.

Lowe, P.P., Gyongyosi, B., Satishchandran, A., Iracheta-Vellve, A., Cho, Y., Ambade, A., and Szabo, G. (2018). Reduced gut microbiome protects from alcohol-induced neuroinflammation

and alters intestinal and brain inflammasome expression. *J. Neuroinflammation* 15, 298.

Lozupone, C.A., and Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 557–578.

Luzón-Toro, B., Fernández, R.M., Torroglosa, A., de Agustín, J.C., Méndez-Vidal, C., Segura, D.I., Antiñolo, G., and Borrego, S. (2013). Mutational Spectrum of Semaphorin 3A and Semaphorin 3D Genes in Spanish Hirschsprung patients. *PLoS ONE* 8, e54800.

Ma, T.Y., Iwamoto, G.K., Hoa, N.T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M.A., and Said, H.M. (2004). TNF- $\alpha$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- $\kappa$ B activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G367-376.

Ma, T.Y., Boivin, M.A., Ye, D., Pedram, A., and Said, H.M. (2005). Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G422-430.

MacFabe, D.F. (2015). Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26.

MacFabe, D.F., Cain, N.E., Boon, F., Ossenkopp, K.-P., and Cain, D.P. (2011). Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.* 217, 47–54.

Macfarlane, S., and Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 67–72.

Madsen, K., Lewis, S., Tavernini, M., Hibbard, J., and Fedorak, R. (1997). Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology* 113, 151–159.

de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Frolli, A., Iardino, P., Carteni, M., De Rosa, M., Francavilla, R., Riegler, G., et al. (2010). Alterations of the Intestinal Barrier in Patients With Autism Spectrum Disorders and in Their First-degree Relatives: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51, 418–424.

Maher, G.M., O’Keeffe, G.W., Kearney, P.M., Kenny, L.C., Dinan, T.G., Mattsson, M., and Khashan, A.S. (2018). Association of Hypertensive Disorders of Pregnancy With Risk of Neurodevelopmental Disorders in Offspring: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 75, 809–819.

Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365.

Mallegol, J., Van Niel, G., Lebreton, C., Lepelletier, Y., Candalh, C., Dugave, C., Heath, J.K.,

Raposo, G., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2007). T84-Intestinal Epithelial Exosomes Bear MHC Class II/Peptide Complexes Potentiating Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Gastroenterology* 132, 1866–1876.

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., et al. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211.

Margolis, K.G., and Gershon, M.D. (2016). Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. *Trends Neurosci.* 39, 614–624.

Margolis, K.G., Stevanovic, K., Karamooz, N., Li, Z.S., Ahuja, A., D'Autréaux, F., Saurman, V., Chalazonitis, A., and Gershon, M.D. (2011). Enteric neuronal density contributes to the severity of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 141, 588–598, 598.e1-2.

Margolis, K.G., Li, Z., Stevanovic, K., Saurman, V., Israelyan, N., Anderson, G.M., Snyder, I., Veenstra-VanderWeele, J., Blakely, R.D., and Gershon, M.D. (2016). Serotonin transporter variant drives preventable gastrointestinal abnormalities in development and function. *J. Clin. Invest.* 126, 2221–2235.

Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., and Furet, J.-P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9, 123.

Marí-Bauset, S., Zazpe, I., Mari-Sanchis, A., Llopis-González, A., and Morales-Suárez-Varela, M. (2014). Food selectivity in autism spectrum disorders: a systematic review. *J. Child Neurol.* 29, 1554–1561.

Marieb, E.N., and Lachaine, R. (2005). *Anatomie et physiologie humaines* (Paris: Pearson Education France).

Martinez-Guryn, K., Leone, V., and Chang, E.B. (2019). Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome. *Cell Host Microbe* 26, 314–324.

Martínez-Moya, P., Romero-Calvo, I., Requena, P., Hernández-Chirlaque, C., Aranda, C.J., González, R., Zarzuelo, A., Suárez, M.D., Martínez-Augustin, O., Marín, J.J.G., et al. (2013). Dose-dependent antiinflammatory effect of ursodeoxycholic acid in experimental colitis. *Int. Immunopharmacol.* 15, 372–380.

Martinot, E., Sèdes, L., Baptissart, M., Lobaccaro, J.-M., Caira, F., Beaudoin, C., and Volle, D.H. (2017). Bile acids and their receptors. *Mol. Aspects Med.* 56, 2–9.

Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., et al. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–1286.

Matsuzawa, T., Kuwae, A., and Abe, A. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III

Effectors EspG and EspG2 Alter Epithelial Paracellular Permeability. *Infect. Immun.* 73, 6283–6289.

Matthews, G.M., Howarth, G.S., and Butler, R.N. (2012). Short-chain fatty acids induce apoptosis in colon cancer cells associated with changes to intracellular redox state and glucose metabolism. *Chemotherapy* 58, 102–109.

McCauley, H.A., and Guasch, G. (2015). Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends Mol. Med.* 21, 492–503.

McClain, J., Grubišić, V., Fried, D., Gomez-Suarez, R.A., Leininger, G.M., Sévigny, J., Parpura, V., and Gulbransen, B.D. (2014). Ca<sup>2+</sup> responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. *Gastroenterology* 146, 497-507.e1.

McElhanon, B.O., McCracken, C., Karpen, S., and Sharp, W.G. (2014). Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *PEDIATRICS* 133, 872–883.

McKinley, M.P., Dean O’Loughlin, V., Stouter Bidle, T., Bélanger, D., Cordeau, M., Des Serres, A., Devito, M., Laflamme, M.-A., Morin, S., and Tarini, L. (2014). Anatomie et physiologie: une approche intégrée (Paris: Maloine).

McLain, J.E., Cytryn, E., Durso, L.M., and Young, S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *J. Environ. Qual.* 45, 432–440.

McVey Neufeld, K.A., Perez-Burgos, A., Mao, Y.K., Bienenstock, J., and Kunze, W.A. (2015). The gut microbiome restores intrinsic and extrinsic nerve function in germ-free mice accompanied by changes in calbindin. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 627–636.

Meissner, G. (1857). Über die nerven der Darmwand. *Z. Für Ration. Med.* 364–366.

Mekjian, H.S., Phillips, S.F., and Hofmann, A.F. (1971). Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids: perfusion studies in man. *J. Clin. Invest.* 50, 1569–1577.

Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* 3, 247–259.

Meşe, G., Richard, G., and White, T.W. (2007). Gap Junctions: Basic Structure and Function. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2516–2524.

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 81.

Mitchell, S., Brian, J., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Szatmari, P., Smith, I., and Bryson, S. (2006). Early language and communication development of infants later diagnosed with autism spectrum disorder. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* 27, S69-78.

- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68.
- Mitsui, R., Ono, S., Karaki, S., and Kuwahara, A. (2005a). Propionate modulates spontaneous contractions via enteric nerves and prostaglandin release in the rat distal colon. *Jpn. J. Physiol.* 55, 331–338.
- Mitsui, R., Ono, S., Karaki, S., and Kuwahara, A. (2005b). Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 17, 585–594.
- Modica, S., Gadaleta, R.M., and Moschetta, A. (2010). Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl. Recept. Signal.* 8.
- Moessner, R., Marshall, C.R., Sutcliffe, J.S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B., Roberts, W., Szatmari, P., et al. (2007). Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 1289–1297.
- Molloy, C.A., Morrow, A.L., Meinzen-Derr, J., Dawson, G., Bernier, R., Dunn, M., Hyman, S.L., McMahon, W.M., Goudie-Nice, J., Hepburn, S., et al. (2006). Familial autoimmune thyroid disease as a risk factor for regression in children with Autism Spectrum Disorder: a CPEA Study. *J. Autism Dev. Disord.* 36, 317–324.
- Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., and Everall, I.P. (2010). Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biol. Psychiatry* 68, 368–376.
- Moriez, R., Abdo, H., Chaumette, T., Faure, M., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2009). Neuroplasticity and neuroprotection in enteric neurons: Role of epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 577–582.
- Mortensen, F.V., Nielsen, H., Mulvany, M.J., and Hessov, I. (1990). Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries. *Gut* 31, 1391–1394.
- Mortensen, F.V., Hessov, I., Birke, H., Korsgaard, N., and Nielsen, H. (1991). Microcirculatory and trophic effects of short chain fatty acids in the human rectum after Hartmann's procedure. *Br. J. Surg.* 78, 1208–1211.
- Mostafa, G.A., and AL-Ayadhi, L.Y. (2015). The possible link between elevated serum levels of epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 (ENA-78/CXCL5) and autoimmunity in autistic children. *Behav. Brain Funct.* 11, 11.
- Mroz, M.S., Keating, N., Ward, J.B., Sarker, R., Amu, S., Aviello, G., Donowitz, M., Fallon, P.G., and Keely, S.J. (2014). Farnesoid X receptor agonists attenuate colonic epithelial secretory function and prevent experimental diarrhoea in vivo. *Gut* 63, 808–817.
- Mroz, M.S., Lajczak, N.K., Goggins, B.J., Keely, S., and Keely, S.J. (2018). The bile acids,

deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid, regulate colonic epithelial wound healing. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *314*, G378–G387.

Mühlbauer, M., Allard, B., Bosserhoff, A.K., Kiessling, S., Herfarth, H., Rogler, G., Schölmerich, J., Jobin, C., and Hellerbrand, C. (2004). Differential effects of deoxycholic acid and taurodeoxycholic acid on NF-kappa B signal transduction and IL-8 gene expression in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *286*, G1000-1008.

Mundy, P., Gwaltney, M., and Henderson, H. (2010). Self-referenced processing, neurodevelopment and joint attention in autism. *Autism Int. J. Res. Pract.* *14*, 408–429.

Nagahama, M., Semba, R., Tsuzuki, M., and Aoki, E. (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol. Signals Recept.* *10*, 336–340.

Nagy, N., and Goldstein, A.M. (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev. Biol.* *293*, 203–217.

Nagy, N., and Goldstein, A.M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin. Cell Dev. Biol.* *66*, 94–106.

Natoli, M., Leoni, B.D., D'Agnano, I., Zucco, F., and Felsani, A. (2012). Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *26*, 1243–1246.

Navarro, F., Pearson, D.A., Fatheree, N., Mansour, R., Hashmi, S.S., and Rhoads, J.M. (2015). Are “leaky gut” and behavior associated with gluten and dairy containing diet in children with autism spectrum disorders? *Nutr. Neurosci.* *18*, 177–185.

Nessel, I., Khashu, M., and Dyall, S.C. (2019). The effects of storage conditions on long-chain polyunsaturated fatty acids, lipid mediators, and antioxidants in donor human milk - A review. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *149*, 8–17.

Neunlist, M., and Schemann, M. (2014). Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *J. Physiol.* *592*, 2959–2965.

Neunlist, M., Toumi, F., Oreschkova, T., Denis, M., Leborgne, J., Laboisse, C.L., Galmiche, J.-P., and Jarry, A. (2003). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *285*, G1028-1036.

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2012). The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 90–100.

Neunlist, M., Rolli-Derkinderen, M., Latorre, R., Van Landeghem, L., Coron, E., Derkinderen, P., and De Giorgio, R. (2014). Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* *147*, 1230–1237.

Newgreen, D.F., and Hartley, L. (1995). Extracellular Matrix and Adhesive Molecules in the Early



Development of the Gut and Its Innervation in Normal and Spotting Lethal Rat Embryos. *Cells Tissues Organs* 154, 243–260.

Nikulin, S.V., Knyazev, E.N., Gerasimenko, T.N., Shilin, S.A., Gazizov, I.N., Zakharova, G.S., Poloznikov, A.A., and Shkurnikov, M.Yu. (2018). Non-Invasive Evaluation of Extracellular Matrix Formation in the Intestinal Epithelium. *Bull. Exp. Biol. Med.* 166, 35–38.

Nøhr, M.K., Pedersen, M.H., Gille, A., Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Husted, A.S., Sichlau, R.M., Grunddal, K.V., Poulsen, S.S., Han, S., et al. (2013). GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology* 154, 3552–3564.

Ohno, H. (2016). Intestinal M cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 159, 151–160.

Onay, H., Kacamak, D., Kavasoglu, A.N., Akgun, B., Yalcinli, M., Kose, S., and Ozbaran, B. (2016). Mutation analysis of the NRXN1 gene in autism spectrum disorders. *Balk. J. Med. Genet. BJMG* 19, 17–22.

Ono, S., Karaki, S., and Kuwahara, A. (2004). Short-chain fatty acids decrease the frequency of spontaneous contractions of longitudinal muscle via enteric nerves in rat distal colon. *Jpn. J. Physiol.* 54, 483–493.

Ostaff, M.J., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2013). Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol. Med.* 5, 1465–1483.

Otani, T., Nguyen, T.P., Tokuda, S., Sugihara, K., Sugawara, T., Furuse, K., Miura, T., Ebnet, K., and Furuse, M. (2019). Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *J. Cell Biol.* 218, 3372–3396.

O’Toole, P.W., and Jeffery, I.B. (2015). Gut microbiota and aging. *Science* 350, 1214–1215.

Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5, e177.

Pan, H., and Gershon, M.D. (2000). Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3295–3309.

Pan, F., Han, L., Zhang, Y., Yu, Y., and Liu, J. (2015). Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 680–685.

Park, J.-H., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., Usui, Y., Hatano, N., Shinohara, M., Saito, Y., et al. (2016). Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. *PloS One* 11, e0156334.

Parracho, H.M. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J. Med. Microbiol.* 54, 987–991.

Pasterkamp, R.J. (2012). Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat. Rev. Neurosci.*

13, 605–618.

Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C., and Brunet, J.F. (1999). The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399, 366–370.

Payette, R.F., Tennyson, V.M., Pomeranz, H.D., Pham, T.D., Rothman, T.P., and Gershon, M.D. (1988). Accumulation of components of basal laminae: Association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of *lsls* mutant mice. *Dev. Biol.* 125, 341–360.

Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I.R., and Lin, J. (2007). Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr. Res.* 61, 37–41.

Peng, L., Li, Z.-R., Green, R.S., Holzman, I.R., and Lin, J. (2009). Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *J. Nutr.* 139, 1619–1625.

Perdikis, D.A., Davies, R., Zhuravkov, A., Brenner, B., Etter, L., and Basson, M.D. (1998). Differential effects of mucosal pH on human (Caco-2) intestinal epithelial cell motility, proliferation, and differentiation. *Dig. Dis. Sci.* 43, 1537–1546.

Perez-Lopez, A., Behnsen, J., Nuccio, S.-P., and Raffatellu, M. (2016). Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 135–148.

Peterson, L.W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153.

Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace, N.R., and Gordon, J.I. (2008). Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe* 3, 417–427.

Pham, T.D., Gershon, M.D., and Rothman, T.P. (1991). Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: Sequence in relation to phenotype. *J. Comp. Neurol.* 314, 789–798.

Piras, I.S., Haapanen, L., Napolioni, V., Sacco, R., Van de Water, J., and Persico, A.M. (2014). Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. *Brain. Behav. Immun.* 38, 91–99.

Pochard, C., Coquenlorge, S., Jaulin, J., Cenac, N., Vergnolle, N., Meurette, G., Freyssinet, M., Neunlist, M., and Rolli-Derkinderen, M. (2016). Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* 150, 168–180.

Poole, D.P., Godfrey, C., Cattaruzza, F., Cottrell, G.S., Kirkland, J.G., Pelayo, J.C., Bunnett, N.W., and Corvera, C.U. (2010). Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system: GpBAR1 regulates intestinal motility. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 814–e228.

Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., Des Varannes, S.B., Neunlist, M., and Derkinderen, P.

(2012). A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *24*, e202-205.

Prelock, P.J., and Nelson, N.W. (2012). Language and Communication in Autism: An Integrated View. *Pediatr. Clin.* *59*, 129–145.

Prigent, A., Gonzales, J., Durand, T., Le Berre-Scoul, C., Rolli-Derkinderen, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2019). Acute inflammation down-regulates alpha-synuclein expression in enteric neurons. *J. Neurochem.* *148*, 746–760.

Pusponogoro, H.D., Ismael, S., Sastroasmoro, S., Firmansyah, A., and Vandenplas, Y. (2015). Maladaptive Behavior and Gastrointestinal Disorders in Children with Autism Spectrum Disorder. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* *18*, 230–237.

Puzan, M., Husic, S., Ghio, C., and Koppes, A. (2018). Enteric Nervous System Regulation of Intestinal Stem Cell Differentiation and Epithelial Monolayer Function. *Sci. Rep.* *8*, 6313.

Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J., and Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* *35*, 833–844.

Rakhilin, N., Garrett, A., Eom, C.-Y., Chavez, K.R., Small, D.M., Daniel, A.R., Kaelberer, M.M., Mejjooli, M.A., Huang, Q., Ding, S., et al. (2019). An intravital window to image the colon in real time. *Nat. Commun.* *10*, 5647.

Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M., and Turner, J.R. (2010). Tight Junction-associated MARVEL Proteins MarvelD3, Tricellulin, and Occludin Have Distinct but Overlapping Functions. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1200–1213.

Ramos, N., Cai, G., Reichert, J.G., Corwin, T.E., Kryzak, L.A., Smith, C.J., Silverman, J.M., Hollander, E., and Buxbaum, J.D. (2006). Family-based association study of TPH1 and TPH2 polymorphisms in autism. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* *141B*, 861–867.

Rao, M., and Gershon, M.D. (2018). Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? *Nat. Rev. Neurosci.* *19*, 552–565.

Rao, M., Nelms, B.D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M.D., and Corfas, G. (2015). Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia* *63*, 2040–2057.

Rao, M., Rastelli, D., Dong, L., Chiu, S., Setlik, W., Gershon, M.D., and Corfas, G. (2017). Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but Are Not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice. *Gastroenterology* *153*, 1068-1081.e7.

Ratcliffe, E.M., Fan, L., Mohammed, T.J., Anderson, M., Chalazonitis, A., and Gershon, M.D. (2011). Enteric neurons synthesize netrins and are essential for the development of the vagal

sensory innervation of the fetal gut. *Dev. Neurobiol.* *71*, 362–373.

Reboul, E. (2013). Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins. *Nutrients* *5*, 3563–3581.

Reikvam, D.H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F.L., Gaustad, P., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Meza-Zepeda, L.A., and Johansen, F.-E. (2011). Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PloS One* *6*, e17996.

Richardson, A., Delbridge, A.T., Brown, N.J., Rumsey, R.D., and Read, N.W. (1991). Short chain fatty acids in the terminal ileum accelerate stomach to caecum transit time in the rat. *Gut* *32*, 266–269.

Rickmann, M., and Wolff, J.R. (1995). S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain. *Neuroscience* *67*, 977–991.

Riddle, K., Cascio, C.J., and Woodward, N.D. (2017). Brain structure in autism: a voxel-based morphometry analysis of the Autism Brain Imaging Database Exchange (ABIDE). *Brain Imaging Behav.* *11*, 541–551.

Rizzatti, G., Lopetuso, L.R., Gibiino, G., Binda, C., and Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *BioMed Res. Int.* *2017*, 1–7.

Robel, S., and Sontheimer, H. (2016). Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nat. Neurosci.* *19*, 28–33.

Roberts, R.R., Murphy, J.F., Young, H.M., and Bornstein, J.C. (2007). Development of colonic motility in the neonatal mouse—studies using spatiotemporal maps. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *292*, G930–G938.

Robertson, M.A., Sigalet, D.L., Holst, J.J., Meddings, J.B., Wood, J., and Sharkey, K.A. (2008). Intestinal Permeability and Glucagon-like peptide-2 in Children with Autism: A Controlled Pilot Study. *J. Autism Dev. Disord.* *38*, 1066–1071.

Robson, M.J., Quinlan, M.A., Margolis, K.G., Gajewski-Kurdziel, P.A., Veenstra-VanderWeele, J., Gershon, M.D., Watterson, D.M., and Blakely, R.D. (2018). p38 $\alpha$  MAPK signaling drives pharmacologically reversible brain and gastrointestinal phenotypes in the SERT Ala56 mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E10245–E10254.

Rodríguez, J.M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R.P., Kober, O.I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M.C., et al. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* *26*.

Roediger, W.E. (1980). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* *21*, 793–798.

Rogers, Y.-H., and Venter, J.C. (2005). Genomics: massively parallel sequencing. *Nature* *437*, 326–327.

- Rose, D.R., Yang, H., Serena, G., Sturgeon, C., Ma, B., Careaga, M., Hughes, H.K., Angkustsiri, K., Rose, M., Hertz-Picciotto, I., et al. (2018a). Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain. Behav. Immun.* *70*, 354–368.
- Rose, S., Bennuri, S.C., Davis, J.E., Wynne, R., Slattery, J.C., Tippet, M., Delhey, L., Melnyk, S., Kahler, S.G., MacFabe, D.F., et al. (2018b). Butyrate enhances mitochondrial function during oxidative stress in cell lines from boys with autism. *Transl. Psychiatry* *8*, 42.
- Rosenbaum, C., Schick, M.A., Wollborn, J., Heider, A., Scholz, C.-J., Cecil, A., Niesler, B., Hirrlinger, J., Walles, H., and Metzger, M. (2016). Activation of Myenteric Glia during Acute Inflammation In Vitro and In Vivo. *PloS One* *11*, e0151335.
- Rosignoli, P., Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Spinuzzi, F., Agea, E., Pelli, M.A., and Morozzi, G. (2001). Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* *22*, 1675–1680.
- Rosignol, D.A., Genuis, S.J., and Frye, R.E. (2014). Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Transl. Psychiatry* *4*, e360.
- Rothman, T.P., Tennyson, V.M., and Gershon, M.D. (1986). Colonization of the bowel by the precursors of enteric glia: studies of normal and congenitally aganglionic mutant mice. *J. Comp. Neurol.* *252*, 493–506.
- Roxas, J.L., and Viswanathan, V.K. (2018). Modulation of Intestinal Paracellular Transport by Bacterial Pathogens. *Compr. Physiol.* *8*, 823–842.
- Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *17*, 777–790.
- Rühl, A., Trotter, J., and Stremmel, W. (2001). Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *13*, 95–106.
- Ryu, A.H., Eckalbar, W.L., Kreimer, A., Yosef, N., and Ahituv, N. (2017). Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci. Rep.* *7*, 7533.
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., and Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev. Espanola Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Espanola Patol. Dig.* *107*, 686–696.
- Sandin, S., Schendel, D., Magnusson, P., Hultman, C., Surén, P., Susser, E., Grønberg, T., Gissler, M., Gunnes, N., Gross, R., et al. (2016). Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Mol. Psychiatry* *21*, 693–700.
- Sandler, R.H., Finegold, S.M., Bolte, E.R., Buchanan, C.P., Maxwell, A.P., Väisänen, M.L.,

- Nelson, M.N., and Wexler, H.M. (2000). Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J. Child Neurol.* *15*, 429–435.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 5463–5467.
- Sankaran-Walters, S., Hart, R., and Dills, C. (2017). Guardians of the Gut: Enteric Defensins. *Front. Microbiol.* *8*, 647.
- Sarangi, A.N., Goel, A., and Aggarwal, R. (2019). Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *J. Clin. Exp. Hepatol.* *9*, 62–73.
- Sasselli, V., Pachnis, V., and Burns, A.J. (2012). The enteric nervous system. *Dev. Biol.* *366*, 64–73.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* *469*, 415–418.
- Sauer, A.K., Bockmann, J., Steinestel, K., Boeckers, T.M., and Grabrucker, A.M. (2019). Altered Intestinal Morphology and Microbiota Composition in the Autism Spectrum Disorders Associated SHANK3 Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Saunders, D.R., Hedges, J.R., Sillery, J., Esther, L., Matsumura, K., and Rubin, C.E. (1975). Morphological and functional effects of bile salts on rat colon. *Gastroenterology* *68*, 1236–1245.
- Saurman, V., Margolis, K.G., and Luna, R.A. (2020). Autism Spectrum Disorder as a Brain-Gut-Microbiome Axis Disorder. *Dig. Dis. Sci.*
- Savage, D.C. (1977). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* *31*, 107–133.
- Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* *132*, 1344–1358.
- Schemann, M., and Neunlist, M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* *16*, 55–59.
- Schopler, E., Reichler, R.J., DeVellis, R.F., and Daly, K. (1980). Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J. Autism Dev. Disord.* *10*, 91–103.
- Schubert, A.M., Sinani, H., and Schloss, P.D. (2015). Antibiotic-Induced Alterations of the Murine Gut Microbiota and Subsequent Effects on Colonization Resistance against *Clostridium difficile*. *MBio* *6*.
- Seaman, C., Anderson, R., Emery, B., and Cooper, H.M. (2001). Localization of the netrin

guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous systems. *Mech. Dev.* *103*, 173–175.

Segain, J.P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H.M., and Galmiche, J.P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* *47*, 397–403.

Seguella, L., Capuano, R., Pesce, M., Annunziata, G., Pesce, M., de Conno, B., Sarnelli, G., Aurino, L., and Esposito, G. (2019). S100B Protein Stimulates Proliferation and Angiogenic Mediators Release through RAGE/pAkt/mTOR Pathway in Human Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* *90*, 859–904.

Seong, C.N., Kang, J.W., Lee, J.H., Seo, S.Y., Woo, J.J., Park, C., Bae, K.S., and Kim, M.S. (2018). Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *J. Microbiol.* *56*, 1–10.

Shah, S.A., Looby, E., Volkov, Y., Long, A., and Kelleher, D. (2005). Ursodeoxycholic acid inhibits translocation of protein kinase C in human colonic cancer cell lines. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *41*, 2160–2169.

Shannon, C.E. (1997). The mathematical theory of communication. 1963. *MD Comput. Comput. Med. Pract.* *14*, 306–317.

Sharkey, K.A., Parr, E.J., and Keenan, C.M. (1999). Immediate-early gene expression in the inferior mesenteric ganglion and colonic myenteric plexus of the guinea pig. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 2755–2764.

Sharon, G., Cruz, N.J., Kang, D.-W., Gandal, M.J., Wang, B., Kim, Y.-M., Zink, E.M., Casey, C.P., Taylor, B.C., Lane, C.J., et al. (2019). Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell* *177*, 1600-1618.e17.

Shindler, A.E., Hill-Yardin, E.L., Petrovski, S., Bishop, N., and Franks, A.E. (2020). Towards Identifying Genetic Biomarkers for Gastrointestinal Dysfunction in Autism. *J. Autism Dev. Disord.* *50*, 76–86.

Shulman, S.T., Friedmann, H.C., and Sims, R.H. (2007). Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin. Infect. Dis.* *45*, 1025–1029.

Shultz, S.R., MacFabe, D.F., Ossenkopp, K.-P., Scratch, S., Whelan, J., Taylor, R., and Cain, D.P. (2008). Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology* *54*, 901–911.

Simeoli, R., Mattace Raso, G., Pirozzi, C., Lama, A., Santoro, A., Russo, R., Montero-Melendez,

T., Berni Canani, R., Calignano, A., Perretti, M., et al. (2017). An orally administered butyrate-releasing derivative reduces neutrophil recruitment and inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *Br. J. Pharmacol.* *174*, 1484–1496.

Simpson, E.H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature* *163*, 688–688.

Simpson, M.J., Zhang, D.C., Mariani, M., Landman, K.A., and Newgreen, D.F. (2007). Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Dev. Biol.* *302*, 553–568.

Sivaprakasam, S., Bhutia, Y.D., Yang, S., and Ganapathy, V. (2017). Short-Chain Fatty Acid Transporters: Role in Colonic Homeostasis. *Compr. Physiol.* *8*, 299–314.

Smith, K., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2007a). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* *19*, 59–69.

Smith, T.K., Spencer, N.J., Hennig, G.W., and Dickson, E.J. (2007b). Recent advances in enteric neurobiology: mechanosensitive interneurons. *Neurogastroenterol. Motil.* *19*, 869–878.

Snoeck, V., Goddeeris, B., and Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* *7*, 997–1004.

Snoek, S.A., Verstege, M.I., Boeckxstaens, G.E., van den Wijngaard, R.M., and de Jonge, W.J. (2010). The enteric nervous system as a regulator of intestinal epithelial barrier function in health and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 637–651.

Soderholm, A.T., and Pedicord, V.A. (2019). Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. *Immunology* *158*, 267–280.

Sommer, F., Anderson, J.M., Bharti, R., Raes, J., and Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 630–638.

Sorci, G., Bianchi, R., Giambanco, I., Rambotti, M.G., and Donato, R. (1999). Replicating myoblasts and fused myotubes express the calcium-regulated proteins S100A1 and S100B. *Cell Calcium* *25*, 93–106.

Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J.P., and Neunlist, M. (2010). Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology* *138*, 1772–1782.

Stappenbeck, T.S. (2009). Paneth Cell Development, Differentiation, and Function: New Molecular Cues. *Gastroenterology* *137*, 30–33.

Stenman, L.K., Holma, R., Eggert, A., and Korpela, R. (2013). A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *304*, G227–234.

Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., and Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling



perspectives. *Acta Histochem.* *120*, 159–167.

Stone, W.L., Lee, E.B., Ashford, L., Brissie, J., Hepburn, S.L., Coonrod, E.E., and Weiss, B.H. (1999). Can autism be diagnosed accurately in children under 3 years? *J. Child Psychol. Psychiatry* *40*, 219–226.

Stoodley, C.J., D’Mello, A.M., Ellegood, J., Jakkamsetti, V., Liu, P., Nebel, M.B., Gibson, J.M., Kelly, E., Meng, F., Cano, C.A., et al. (2017). Altered cerebellar connectivity in autism and cerebellar-mediated rescue of autism-related behaviors in mice. *Nat. Neurosci.* *20*, 1744–1751.

Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., Jousson, O., Leoncini, S., Renzi, D., Calabrò, A., et al. (2017). New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome* *5*, 24.

Sturm, A., and Dignass, A.U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *14*, 348.

Stutzmann, J., Bellissent-Waydelich, A., Fontao, L., Launay, J.F., and Simon-Assmann, P. (2000). Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microsc. Res. Tech.* *51*, 179–190.

Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Kubo, C., and Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* *558*, 263–275.

Sullivan, A., Edlund, C., and Nord, C.E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* *1*, 101–114.

Sun, Y. (2004). Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut* *53*, 362–367.

Sun, M.-F., Zhu, Y.-L., Zhou, Z.-L., Jia, X.-B., Xu, Y.-D., Yang, Q., Cui, C., and Shen, Y.-Q. (2018). Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson’s disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- $\alpha$  signaling pathway. *Brain. Behav. Immun.* *70*, 48–60.

Suply, E., de Vries, P., Soret, R., Cossais, F., and Neunlist, M. (2012). Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *302*, G1373-1380.

Suzuki, K., Matsuzaki, H., Iwata, K., Kamenno, Y., Shimmura, C., Kawai, S., Yoshihara, Y., Wakuda, T., Takebayashi, K., Takagai, S., et al. (2011). Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PloS One* *6*, e20470.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* *11*, 443–451.

- Tam, P.K. (1990). An immunohistological study of the human enteric nervous system with microtubule-associated proteins. *Gastroenterology* *99*, 1841–1844.
- Tamagnone, L., and Comoglio, P.M. (2000). Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol.* *10*, 377–383.
- Tamagnone, L., and Comoglio, P.M. (2004). To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *EMBO Rep.* *5*, 356–361.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D.L.E., Nalin, R., et al. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* *11*, 2574–2584.
- Taraviras, S., Marcos-Gutierrez, C.V., Durbec, P., Jani, H., Grigoriou, M., Sukumaran, M., Wang, L.C., Hynes, M., Raisman, G., and Pachnis, V. (1999). Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 2785–2797.
- Tatavarty, V., Pacheco, A.T., Lin, H., Miska, N.J., Hengen, K.B., Wagner, F.F., and Turrigiano, G.G. (2018). Autism-associated Shank3 is essential for homeostatic plasticity and neuronal circuit stability. *BioRxiv* 365445.
- Taupin, D., and Podolsky, D.K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 721–732.
- Taylor, L.E., Swerdfeger, A.L., and Eslick, G.D. (2014). Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine* *32*, 3623–3629.
- Thabtah, F., and Peebles, D. (2019). Early Autism Screening: A Comprehensive Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* *16*, 3502.
- Thangaraju, M., Cresci, G.A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J.P., Browning, D.D., Mellinger, J.D., Smith, S.B., Digby, G.J., Lambert, N.A., et al. (2009). GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res.* *69*, 2826–2832.
- de Theije, C.G.M., Koelink, P.J., Korte-Bouws, G.A.H., Lopes da Silva, S., Korte, S.M., Olivier, B., Garssen, J., and Kraneveld, A.D. (2014). Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* *37*, 240–247.
- Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., and Scheuermann, D.W. (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* *118*, 331–340.
- Tortora, G.J., and Derrickson, B.H. (2013). *Principes d’anatomie et de physiologie* (Bruxelles: De Boeck).

- Tough, I.R., Forbes, S., and Cox, H.M. (2018). Signaling of free fatty acid receptors 2 and 3 differs in colonic mucosa following selective agonism or coagonism by luminal propionate. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *30*, e13454.
- Tran, T.S., Kolodkin, A.L., and Bharadwaj, R. (2007). Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 263–292.
- Trendelenburg, P. (1917). Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. *Arch. Für Exp. Pathol. Pharmacol.* *81*, 55–129.
- Trier, J.S., Allan, C.H., Marcial, M.A., and Madara, J.L. (1987). Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *Anat. Rec.* *219*, 69–77.
- Tulstrup, M.V.-L., Christensen, E.G., Carvalho, V., Linninge, C., Ahrné, S., Højberg, O., Licht, T.R., and Bahl, M.I. (2015). Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PloS One* *10*, e0144854.
- Uesaka, T., Nagashimada, M., Yonemura, S., and Enomoto, H. (2008). Diminished Ret expression compromises neuronal survival in the colon and causes intestinal aganglionosis in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1890–1898.
- Uesaka, T., Nagashimada, M., and Enomoto, H. (2013). GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 16372–16382.
- Van Eldik, L.J., and Wainwright, M.S. (2003). The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* *21*, 97–108.
- Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.* *68*, 403–429.
- Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M.M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T., and Neunlist, M. (2011). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *300*, G976–987.
- Varon, C., Duriez, A., Lehours, P., Ménard, A., Layé, S., Zerbib, F., Mégraud, F., and Laharie, D. (2009). Study of *Helicobacter pullorum* proinflammatory properties on human epithelial cells in vitro. *Gut* *58*, 629–635.
- Verbeke, L., Farre, R., Verbinnen, B., Covens, K., Vanuytsel, T., Verhaegen, J., Komuta, M., Roskams, T., Chatterjee, S., Annaert, P., et al. (2015). The FXR Agonist Obeticholic Acid Prevents Gut Barrier Dysfunction and Bacterial Translocation in Cholestatic Rats. *Am. J. Pathol.* *185*, 409–419.
- Vives, V., Alonso, G., Solal, A.C., Joubert, D., and Legraverend, C. (2003). Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J. Comp.*

Neurol. 457, 404–419.

Vogel, C., and Marcotte, E.M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 13, 227–232.

de Vries, P., Soret, R., Suply, E., Heloury, Y., and Neunlist, M. (2010). Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G539-547.

Vrieze, A., Holleman, F., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Hoekstra, J.B.L., and Nieuwdorp, M. (2010). The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* 53, 606–613.

Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36, 291–300.

Wang, Z., and Zhao, Y. (2018). Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. *Protein Cell* 9, 416–431.

Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., and Liu, Y.-C. (2012a). Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Dig. Dis. Sci.* 57, 3126–3135.

Wang, L.-L., Fan, Y., Zhou, F.-H., Li, H., Zhang, Y., Miao, J.-N., Gu, H., Huang, T.-C., and Yuan, Z.-W. (2011a). Semaphorin 3A expression in the colon of Hirschsprung disease. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 91, 842–847.

Wang, L.-L., Zhang, Y., Fan, Y., Li, H., Zhou, F.-H., Miao, J.-N., Gu, H., Huang, T.-C., and Yuan, Z.-W. (2012b). SEMA3A rs7804122 polymorphism is associated with Hirschsprung disease in the Northeastern region of China. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 94, 91–95.

Wang, N., Wang, G., Hao, J., Ma, J., Wang, Y., Jiang, X., and Jiang, H. (2012c). Curcumin ameliorates hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by upregulating heme oxygenase-1 expression in human intestinal epithelial cells. *Dig. Dis. Sci.* 57, 1792–1801.

Wang, T., Shan, L., Du, L., Feng, J., Xu, Z., Staal, W.G., and Jia, F. (2016). Serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 25, 341–350.

Wang, X., Chan, A.K.K., Sham, M.H., Burns, A.J., and Chan, W.Y. (2011b). Analysis of the Sacral Neural Crest Cell Contribution to the Hindgut Enteric Nervous System in the Mouse Embryo. *Gastroenterology* 141, 992-1002.e6.

Wang, Z., Ocadiz-Ruiz, R., Sundaresan, S., Ding, L., Hayes, M., Sahoo, N., Xu, H., and Merchant, J.L. (2018). Isolation of Enteric Glial Cells from the Submucosa and Lamina Propria of the Adult Mouse. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Ward, S.M. (2000). Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut* 47 Suppl 4, iv40-

43; discussion iv52.

Ward, S.M., and Sanders, K.M. (2001). Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat. Rec.* 262, 125–135.

Ward, D.M., Weller, R., and Bateson, M.M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345, 63–65.

Ward, J.B.J., Mroz, M.S., and Keely, S.J. (2013). The bile acid receptor, TGR5, regulates basal and cholinergic-induced secretory responses in rat colon. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 708–711.

Waye, M.M.Y., and Cheng, H.Y. (2018). Genetics and epigenetics of autism: A Review. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 72, 228–244.

Weber, C.R., Raleigh, D.R., Su, L., Shen, L., Sullivan, E.A., Wang, Y., and Turner, J.R. (2010). Epithelial Myosin Light Chain Kinase Activation Induces Mucosal Interleukin-13 Expression to Alter Tight Junction Ion Selectivity. *J. Biol. Chem.* 285, 12037–12046.

Wei, S.-C., Yang-Yen, H.-F., Tsao, P.-N., Weng, M.-T., Tung, C.-C., Yu, L.C.H., Lai, L.-C., Hsiao, J.-H., Chuang, E.Y., Shun, C.-T., et al. (2017). SHANK3 Regulates Intestinal Barrier Function Through Modulating ZO-1 Expression Through the PKC $\epsilon$ -dependent Pathway. *Inflamm. Bowel Dis.* 23, 1730–1740.

Welch, M.G., Margolis, K.G., Li, Z., and Gershon, M.D. (2014). Oxytocin regulates gastrointestinal motility, inflammation, macromolecular permeability, and mucosal maintenance in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G848-862.

Wells, J.M., Brummer, R.J., Derrien, M., MacDonald, T.T., Troost, F., Cani, P.D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., de Vos, W.M., et al. (2017). Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312, G171–G193.

Wilen, C.B., Lee, S., Hsieh, L.L., Orchard, R.C., Desai, C., Hykes, B.L., McAllaster, M.R., Balce, D.R., Feehley, T., Brestoff, J.R., et al. (2018). Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science* 360, 204–208.

Wing, L. (1981). Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol. Med.* 11, 115–129.

Wood, J.D. (2016). Enteric Nervous System: Neuropathic Gastrointestinal Motility. *Dig. Dis. Sci.* 61, 1803–1816.

Wood, J.D., Alpers, D.H., and Andrews, P.L. (1999). Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45 Suppl 2, II6–II16.

Woodbury-Smith, M., and Scherer, S.W. (2018). Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Dev. Med. Child Neurol.* 60, 445–451.

Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., et al. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut

microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108.

Wu, G.D., Compher, C., Chen, E.Z., Smith, S.A., Shah, R.D., Bittinger, K., Chehoud, C., Albenberg, L.G., Nessel, L., Gilroy, E., et al. (2016). Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut* 65, 63–72.

Wu, S., Wu, F., Ding, Y., Hou, J., Bi, J., and Zhang, Z. (2017a). Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr. Scand.* 135, 29–41.

Wu, W., Sun, M., Chen, F., Cao, A.T., Liu, H., Zhao, Y., Huang, X., Xiao, Y., Yao, S., Zhao, Q., et al. (2017b). Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43. *Mucosal Immunol.* 10, 946–956.

Xiang, A.H., Wang, X., Martinez, M.P., Walthall, J.C., Curry, E.S., Page, K., Buchanan, T.A., Coleman, K.J., and Getahun, D. (2015). Association of maternal diabetes with autism in offspring. *JAMA* 313, 1425–1434.

Xiao, W.-D., Chen, W., Sun, L.-H., Wang, W.-S., Zhou, S.-W., and Yang, H. (2011). The protective effect of enteric glial cells on intestinal epithelial barrier function is enhanced by inhibiting inducible nitric oxide synthase activity under lipopolysaccharide stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 527–534.

Yajima, T. (1985). Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J. Physiol.* 368, 667–678.

Yamanashi, Y., Takada, T., Kurauchi, R., Tanaka, Y., Komine, T., and Suzuki, H. (2017). Transporters for the Intestinal Absorption of Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K. *J. Atheroscler. Thromb.* 24, 347–359.

Yan, H., and Ajuwon, K.M. (2017). Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PloS One* 12, e0179586.

Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227.

Yoo, B.B., and Mazmanian, S.K. (2017). The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity* 46, 910–926.

Young, H.M., Jones, B.R., and McKeown, S.J. (2002). The Projections of Early Enteric Neurons Are Influenced by the Direction of Neural Crest Cell Migration. *J. Neurosci.* 22, 6005–6018.

Young, H.M., Bergner, A.J., and Müller, T. (2003). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J. Comp. Neurol.* 456, 1–11.

Young, H.M., Bergner, A.J., Anderson, R.B., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D.F., and

- Whittington, P.M. (2004). Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev. Biol.* 270, 455–473.
- Young, H.M., Turner, K.N., and Bergner, A.J. (2005). The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res.* 320, 1–9.
- Zerbo, O., Leong, A., Barcellos, L., Bernal, P., Fireman, B., and Croen, L.A. (2015). Immune mediated conditions in autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* 46, 232–236.
- Zhang, D.K., He, F.Q., Li, T.K., Pang, X.H., Cui, D.J., Xie, Q., Huang, X.L., and Gan, H.T. (2010). Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J. Pathol.* 222, 213–222.
- Zhang, K., Hornef, M.W., and Dupont, A. (2015). The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity: The epithelium as a barrier to infection. *Cell. Microbiol.* 17, 1561–1569.
- Zhang, W., Segura, B.J., Lin, T.R., Hu, Y., and Mulholland, M.W. (2003). Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. *Glia* 42, 252–262.
- Zhang, Y., Wu, S., Xia, Y., and Sun, J. (2013). Salmonella infection upregulates the leaky protein claudin-2 in intestinal epithelial cells. *PloS One* 8, e58606.
- Zhao, Y., Chen, F., Wu, W., Sun, M., Bilotta, A.J., Yao, S., Xiao, Y., Huang, X., Eaves-Pyles, T.D., Golovko, G., et al. (2018). GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal Immunol.* 11, 752–762.
- Zhdanov, A.V., Okkelman, I.A., Golubeva, A.V., Doerr, B., Hyland, N.P., Melgar, S., Shanahan, F., Cryan, J.F., and Papkovsky, D.B. (2017). Quantitative analysis of mucosal oxygenation using ex vivo imaging of healthy and inflamed mammalian colon tissue. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 141–151.
- Zimmer, J., Lange, B., Frick, J.-S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., Rusch, K., Klosterhalfen, S., and Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66, 53–60.
- Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Rogers, T., Roberts, W., Brian, J., and Szatmari, P. (2005). Behavioral manifestations of autism in the first year of life. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 23, 143–152.

**Titre : Etudes des fonctions digestives et du système nerveux entérique dans les pathologies neurodéveloppementales digestives et cérébrales**

**Mots-clés :** Surnageants fécaux, sémaphorine 3A, système nerveux entérique, barrière épithéliale intestinale, microbiote intestinal, pathologies neurodéveloppementales

**Résumé :** La période périnatale est une période cruciale dans le développement et la maturation des organismes, pouvant être modulée par divers facteurs génétiques et environnementaux.

Le tube digestif est essentiel à la survie des organismes. Parmi ces constituants, le système nerveux entérique (SNE) joue un rôle clef dans le maintien de l'homéostasie digestive. Le SNE colonise précocement le tube digestif dès la période embryonnaire et poursuit sa maturation pendant la période périnatale. Néanmoins, les facteurs responsables de la maturation du SNE sont encore peu identifiés.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la sémaphorine 3A, une molécule impliquée dans les processus de maturation du système nerveux central, pourrait participer à la maturation du SNE. Nos résultats montrent qu'elle inhibe la poussée axonale et diminue la connectivité des neurones entériques dans la période embryonnaire *in vitro*.

Par ailleurs, de nombreux troubles gastro-intestinaux sont observés dans les pathologies neurodéveloppementales digestives et centrales. Ces derniers pourraient être dus à une modification du SNE. Parmi les facteurs et mécanismes capables de remodeler le SNE, le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle important.

De ce fait, ce travail de thèse visait à identifier l'implication des métabolites du microbiote intestinal dans les atteintes digestives des patients atteints de trouble du spectre autistique. Nos résultats montrent que les métabolites présents dans les selles de ces patients peuvent induire un remodelage du SNE et de la barrière épithéliale intestinale ainsi qu'une modification de la perméabilité colique *in vivo*.

En conclusion, ces travaux permettent de mieux comprendre les processus de maturation du SNE dans la période périnatale et montrent que le microbiote intestinal pourrait être impliqué dans le développement des troubles digestifs observés chez les patients atteints de trouble du spectre autistique.

**Title : Digestive functions and the enteric nervous system in digestive and cerebral neurodevelopmental diseases**

**Keywords :** Fecal supernatants, semaphorin 3A, enteric nervous system, intestinal epithelial barrier, intestinal microbiota, neurodevelopmental diseases

**Abstract :** The perinatal period is a crucial period for the development and maturation of organisms, which can be modulated by various genetic and environmental factors.

The digestive tract is essential for the survival of organisms. Among its constituents, the enteric nervous system (ENS) plays a key role in maintaining digestive homeostasis. The ENS colonizes the digestive tract during the embryonic period and continues to mature during the perinatal period. Nevertheless, the factors responsible for its maturation remain unknown.

We hypothesized that semaphorin 3A, a molecule involved in the processes of central nervous system maturation, may be also involved in the maturation of the ENS. *In vitro*, our results show that semaphorin 3A inhibits axonal growth and decreases the connectivity of enteric neurons during the embryonic period.

In addition, in digestive and central neurodevelopmental pathologies, many gastrointestinal disorders are observed. These could be due to a modification of the ENS. Among the factors and mechanisms capable of remodeling the ENS, the intestinal microbiota could play an important role.

Therefore, the aim of this thesis was to identify the involvement of the microbiota-derived metabolites in the onset of digestive disorders observed in patients with autism spectrum disorders. Our results show that the microbial metabolites of these patients can induce a remodeling of the ENS and intestinal epithelial barrier as well as a modification of the colonic permeability *in vivo*.

In conclusion, this work provides a better understanding of the maturation processes of the ENS and shows that the intestinal microbiota could be involved in the onset of digestive disorders observed in patients with autism spectrum disorders.