

**Université de Limoges**

**ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)**

**Pharmacologie & Transplantation – Inserm U1248**

Thèse pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

Pharmacologie, infectiologie et sciences du médicament

Présentée et soutenue par

**Manon Jardou**

Le 21 septembre 2023

**Rôle du co-métabolome intestinal en  
transplantation : contribution des acides gras à  
chaîne courte à l'homéostasie digestive et à  
l'immunomodulation**

Thèse dirigée par Pr Nicolas Picard et Dr Roland Lawson

***JURY :***

**Présidente du jury**

Mme. Mireille Verdier, PU, UMR 1308 CAPTuR, Université de Limoges

**Rapporteurs**

Mme. Fabienne Thomas, MCU-PH, UMR 1037 CRCT, Université de Toulouse III  
Paul Sabatier

M. Mathias Richard, DR, Institut MICALIS, Université Paris-Saclay

**Examineurs**

Mme. Estelle Ayme-Dietrich, MCU-PH, UR 7296 LPTNC, Université de Strasbourg

M. Roland Lawson, MCU, UMR 1248 P&T, Université de Limoges

M. Nicolas Picard, PU-PH, UMR 1248 P&T, Université de Limoges

À mon papa,

*Rien dans la vie n'est à craindre, tout est à comprendre.*

**Marie Curie**

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à l'**Université de Limoges** et l'**École Doctorale Biologie Chimie Santé** de m'avoir octroyé l'opportunité d'effectuer cette thèse ainsi que de m'avoir formé.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Au Pr **Pierre Marquet**, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Pharmacologie et Transplantation, je suis ravie d'avoir pu apprendre à vos côtés.

Au Pr **Nicolas Picard**, je vous remercie pour votre encadrement et je me sens extrêmement chanceuse d'avoir eu l'opportunité de travailler à vos côtés.

Au Dr **Roland Lawson**, je tiens à t'exprimer mes plus chaleureux remerciements pour tout ton encadrement, ton soutien, ton encouragement, et ta passion pour la recherche. Je tiens à te remercier pour m'avoir fait découvrir le monde de la pharmacie que je connaissais peu. Je tiens vraiment à exprimer ma reconnaissance pour l'attention que tu as portée à chaque étape de ma thèse, en me guidant avec bienveillance. Merci.

À **Anne**, je te remercie pour ta disponibilité, pour toutes nos discussions autour de la thématique ainsi que pour ton aide pour l'expérimentation animale.

À **Clarisse**, *la pépète*, je tiens à te remercier pour tout le soutien extraordinaire que tu m'as apporté au cours de ma thèse. Ta présence au sein du bureau 242 a été un véritable moteur dans cette aventure, et je suis profondément reconnaissante d'avoir eu une personne aussi précieuse et attentionnée. *Tout'schuss !*

À **Roy**, *Roylito*, je tiens à te remercier pour toutes nos discussions et ta bonne humeur partagée (et tes traductions) au sein du bureau 242. Essaie de prendre bien soin de tes plantes.

À **Eliès**, je te remercie pour tous les moments de rires et ta voix d'ange au karaoké.

À **Hassan**, *Docteur Aouad*, je te remercie sincèrement pour m'avoir montré les ficelles du métier, et toutes nos expériences de MLR jusqu'à pas d'heure, le vendredi ... Merci.

À **Quentin**, *Docteur Faucher*, je te remercie pour toutes ces discussions autour de la vulgarisation de la recherche. *Mais c'est incroyable ça Quentin !*

À **Émilie**, je te remercie pour m'avoir transmis tes connaissances en spectrométrie de masse, ton aide pour les dilutions, cela a été un réel plaisir d'apprendre et de travailler avec toi.

À **François-Ludovic**, je te remercie pour ta disponibilité et tes conseils en spectrométrie de masse.

À **Emmanuelle**, *Manue, mémère la dactylo*, je te remercie de ta disponibilité pour les affaires administratives, et ta bonne humeur au quotidien.

À **Jean-Sébastien**, je te remercie pour ton aide au quotidien et ta bonne humeur.

À **Hélène**, je te remercie pour toute l'expérience que tu m'as apportée pour le séquençage, la biologie moléculaire ainsi que la culture cellulaire.

À tous les **membres de l'unité Inserm 1248**, je tiens à vous remercier pour le travail auquel vous avez contribué.

À **Quentin L**, je te remercie pour tous ces bons moments passés ensemble à la faculté des Sciences depuis le premier jour en licence et ton aide pour les panels en cytométrie.

À tous les stagiaires qui sont passés par la team microbiote et un clin d'œil particulier à **Amandine, Jimon et Isy**, ainsi qu'Élisa pour votre travail accompli, votre investissement, votre joie de vivre, vos TikTok, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

À tout le personnel de la plateforme **BISCEm** (Fabienne, Claire, Magali, Catherine), je vous remercie pour votre disponibilité et vos conseils.

À mon **papa**, qui d'où tu es, tu veilles sur moi.

À ma **maman**, *mamoune*, qui malgré les difficultés rencontrées a toujours été et sera toujours là pour moi. Je t'aime.

À mon frère, **Thomas**, merci d'avoir été là tout au long de cette thèse et de m'avoir changé les idées, surtout durant cette dernière année d'écriture.

À **Romain**, je te remercie pour ton soutien inconditionnel durant ces 3 années de thèse. Ta présence bienveillante m'a donné la force de persévérer et de continuer à avancer, même lorsque je doutais de moi-même. Je tiens sincèrement à te remercier pour toute l'aide que tu m'as apporté afin de rédiger cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille et mes amis pour votre amour et votre bienveillance apportés au cours de ces dernières années.

*Merci !*

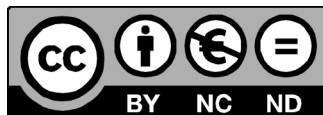
## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Remerciements .....	4
Droits d'auteurs .....	6
Table des matières.....	7
Liste des abréviations.....	8
Table des illustrations.....	9
Table des tableaux.....	11
Introduction générale.....	12
Chapitre I. Microbiote digestif et transplantation .....	15
Chapitre II. Impact du protocole d'immunosuppression sur l'homéostasie de la barrière intestinale .....	42
II.1. Description de la barrière intestinale .....	42
II.2. La barrière intestinale lors de l'entéropathie médicamenteuse .....	48
II.3. Le profil pharmacologique de l'acide mycophénolique.....	48
II.4. L'entéropathie induite par l'acide mycophénolique.....	52
II.5. Hypothèses mécanistiques de l'entéropathie induite par le MPA.....	54
II.6. Objectifs.....	55
II.7. Travail expérimental 1 : Évaluation de la perméabilité intestinale chez les patients transplantés traités à l'acide mycophénolique basée sur la quantification plasmatique des lipopolysaccharides et des acides gras à chaîne courte .....	56
II.8. Travail expérimental 2 : Altérations du microbiote digestif dans l'entéropathie induite par l'acide mycophénolique : impact sur le profil des acides gras à chaîne courte dans un modèle murin .....	76
II.9. Travail expérimental 3 : Étude des effets d'une supplémentation en SCFA pour la prise en charge de l'entéropathie induite par le MPA.....	86
II.10. Conclusion et perspectives du chapitre 2.....	109
Chapitre III. Acides gras à chaîne courte comme modulateurs du système immunitaire.....	111
III.1. Réaction lymphocytaire mixte avec le butyrate .....	111
III.2. Développement du modèle de greffe de peau .....	113
III.3. Mise au point de la supplémentation systémique en SCFA .....	118
III.4. Conclusion et perspectives du chapitre 3.....	121
Chapitre IV. Synthèse et perspective en médecine de précision.....	122
Références bibliographiques.....	125
Annexes .....	135

## Liste des abréviations

---

**3NPH** : 3-Nitrophenylhydrazine hydrochloride

**AcMPAG** : acyl MPAG

**ACN/AF** : acétonitrile/acide formique

**CES** : carboxylestérases

**CYP** : cytochromes P450

**DM-MPA** : desméthyl-MPA

**DSS** : dextran sulfate de sodium

**EDC** : N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride

**HES** : hématoxyline éosine et safran

**IgA** : immunoglobuline A

**IL** : interleukine

**IMPDH** : inosine-5'-monophosphate déshydrogénase 2

**LB** : lymphocyte B

**LC/MSMS** : chromatographie liquide coulée à la spectrométrie de masse en tandem

**LPS** : lipopolysaccharides

**LT** : lymphocyte T

**LTreg** : lymphocyte T régulateur

**MMF** : mycophénolate mofétil

**MPA** : acide mycophénolique

**MPAG** : MPA-7-O-glucuronide

**MUC-2** : mucine-2

**PBMC** : cellules mononucléées périphériques du sang

**pIgR** : récepteur des immunoglobulines polymériques

**RLM** : réaction lymphocytaire mixte

**SCFA** : short chain fatty acids

**TMAO** : triméthylamine-N-oxyde

**UGT** : UDP-glucuronosyltransférases

**ZO1** : zonula occludens 1



## Table des illustrations

---

Figure 1 – Métabolites issus du microbiote digestif ou co-métabolome et leurs fonctions .....	13
Figure 2 – Composition de la barrière épithéliale intestinale .....	43
Figure 3 – Différents types de cellules épithéliales intestinales .....	44
Figure 4 – Complexes jonctionnels des cellules épithéliales intestinales .....	45
Figure 5 – Immunoglobuline A sécrétoire.....	47
Figure 6 – Mécanisme d’inhibition de l’acide mycophénolique.....	49
Figure 7 – Ensemble des voies métaboliques de l’acide mycophénolique.....	50
Figure 8 – Métabolisation du MMF.....	51
Figure 9 – Différents types de courbes de concentration plasmatique en fonction du temps du MPA .....	52
Figure 10 – Pourcentage de perte du greffon à 4 ans chez des patients transplantés rénaux.....	53
Figure 11 – Atteintes histologiques dues au traitement au MMF .....	53
Figure 12 – Hypothèses sur les mécanismes impliqués lors de la toxicité gastro-intestinale du MPA .....	55
Figure 13 – Plan d’expérience pour le développement du modèle précoce d’entéropathie et la supplémentation en butyrate .....	88
Figure 14 – Variation du poids corporel (%) par rapport à J0.....	93
Figure 15 – Poids et nombre de cellules de la rate .....	94
Figure 16 – Photographies du cæcum et du côlon proximal.....	94
Figure 17 – Longueur du côlon et poids du cæcum .....	95
Figure 18 – Immunomarquage de la protéine de jonction serrée, ZO1.....	96
Figure 19 – Concentrations en MPA et MPAG dans le plasma et les fèces.....	97
Figure 20 – Dosage des SCFA dans le plasma des souris à J8.....	98
Figure 21 – Évolution du profil des SCFA dans les fèces des souris à J0, J4 et J8.....	99
Figure 22 – Variation du poids corporel (%) par rapport à J0.....	101
Figure 23 – Poids et nombre de cellules de la rate .....	101
Figure 24 – Photographies du cæcum et du côlon proximal.....	102
Figure 25 – Longueur du côlon et poids du cæcum .....	102
Figure 26 – Immunomarquage de ZO1 .....	103
Figure 27 – Concentrations en MPA et MPAG dans le plasma et les fèces.....	104
Figure 28 – Dosage des SCFA dans le plasma des souris à J8.....	105

<b>Figure 29 – Évolution du profil des SCFA dans les fèces des souris à J0, J4 et J8...</b>	<b>106</b>
<b>Figure 30 – Principe de la méthode de réaction lymphocytaire mixte .....</b>	<b>112</b>
<b>Figure 31 – Prolifération et viabilité cellulaire lors d’une expérience de RLM en présence de butyrate .....</b>	<b>113</b>
<b>Figure 32 – Procédure de récupération des greffons .....</b>	<b>114</b>
<b>Figure 33 – Protocole de greffe de peau .....</b>	<b>114</b>
<b>Figure 34 – Paramètres de suivi des souris ainsi que leur greffons .....</b>	<b>115</b>
<b>Figure 35 – Architecture de la peau saine et d’une isogreffe. ....</b>	<b>116</b>
<b>Figure 36 – Score histologique des greffes de peau .....</b>	<b>117</b>
<b>Figure 37 – Fonctionnement et implantation des micro-pompes osmotiques.....</b>	<b>118</b>
<b>Figure 38 – Concentrations en SCFA chez les souris implantées d’une micro-pompe osmotique .....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 39 – Concentrations en SCFA chez les souris supplémentées dans l’eau de boisson.....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 40 – Concentrations en SCFA chez les souris traitées en butyrate par administration orale .....</b>	<b>120</b>
<b>Figure 41 – Stratégie de médecine de précision .....</b>	<b>124</b>

## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1 – Paramètres évaluant l’entéropathie liée au MPA.....</b>	<b>100</b>
--	------------

## Introduction générale

---

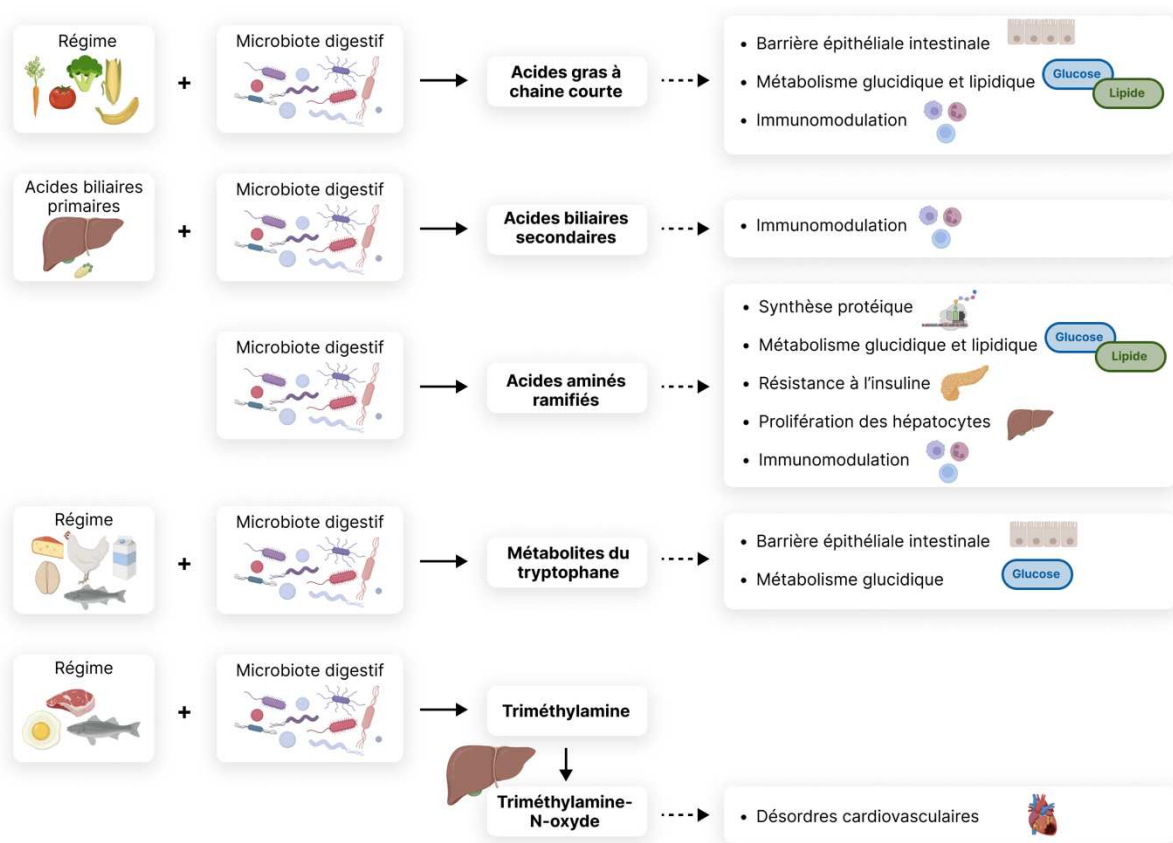
Le recours à la transplantation d'organe est parfois proposé aux patients pour la prise en charge de certaines pathologies terminales. En France, en 2021, 5 901 greffes d'organes solides ont pu être réalisées [1]. La survie à court terme des greffons s'est considérablement améliorée ces dernières années (environ 90% de survie à 1 an) mais le taux de survie à long terme n'a pas bénéficié des mêmes améliorations (environ 60% de survie à 10 ans) [1]. Cependant, les approches diagnostiques actuelles n'ont ni la sensibilité et ni la spécificité nécessaires pour identifier suffisamment tôt les épisodes de rejet de greffe. De plus, la confirmation d'un épisode de rejet nécessite des biopsies invasives, coûteuses, et dont l'interprétation reste parfois difficile et subjective [2]. Actuellement, l'un des défis majeurs dans le domaine de la transplantation est de trouver de nouveaux biomarqueurs, idéalement non invasifs et disposant d'une forte valeur prédictive pour permettre une amélioration de la prise en charge et de la qualité de vie des patients et surtout permettant d'augmenter la durée de vie du greffon [3].

Les traitements immunosuppresseurs sont actuellement l'un des piliers de la prise en charge des transplantés. Différents protocoles combinant plusieurs médicaments immunosuppresseurs à visée synergique ont été mis en place afin d'inhiber efficacement la réponse immunitaire du transplanté et dont le but est de minimiser le risque de rejet [4]. Malheureusement, ce protocole d'immunosuppression est associé à une augmentation du risque d'infections fongiques, bactériennes et virales, d'atteintes tumorales, et expose les patients à une forte iatrogénie médicamenteuse [5].

Dans une perspective de médecine de précision en transplantation, il est important de maîtriser les facteurs de variabilité de la réponse thérapeutique aux immunosuppresseurs. De récentes avancées dans l'étude du microbiote digestif (Human Microbiome Project [6]) soulignent le rôle fondamental de ce microbiote dans la maintenance de l'homéostasie digestive ainsi que dans la régulation du système immunitaire [7]. En effet, les espèces microbiennes (bactéries, champignons, virus) au sein du tube digestif permettent le maintien de l'homéostasie par contact direct avec les cellules de l'hôte ou par communication indirecte via des métabolites [8]. La barrière intestinale intacte représente la première ligne de défense contre l'invasion des pathogènes et les processus inflammatoires, grâce à un microbiote sain et des jonctions intercellulaires jointives [9]. Lorsque la barrière intestinale est endommagée, les bactéries et leurs toxines peuvent transiter à travers les jonctions intercellulaires serrées endommagées afin de rejoindre la circulation systémique entraînant une endotoxémie pouvant mener à une inflammation chronique de bas grade [10].

Le microbiote digestif est également étroitement lié aux autres organes de l'hôte et va exercer ses actions pour le maintien de l'homéostasie grâce à la synthèse de métabolites

ayant divers rôles, et regroupés sous le terme « co-métabolome » (**Figure 1**) [11]. Parmi ces métabolites, nous retrouvons les acides gras à chaîne courte (*short-chain fatty acids*, SCFA) dont les représentants majeurs sont l'acétate, le propionate et le butyrate, produits à partir des fibres alimentaires non digérées. Les SCFA participent à l'homéostasie de la barrière intestinale [12], améliorent le métabolisme du glucose et des lipides [13], régule le système immunitaire et les réponses inflammatoires [7]. Les acides biliaires primaires issus du foie sont également métabolisés par le microbiote digestif en acides biliaires secondaires ayant un rôle dans l'immunomodulation [14]. Les micro-organismes du tractus digestif participent également à la synthèse des acides aminés ramifiés (*i.e.*, valine, isoleucine et leucine) qui régulent la synthèse des protéines, le métabolisme du glucose et des lipides, la résistance à l'insuline, la prolifération des hépatocytes et l'immunité [15]. Les métabolites du tryptophane produits par certaines espèces bactériennes renforcent l'intégrité de la barrière intestinale et améliorent le métabolisme du glucose [16]. Enfin, le microbiote intestinal peut synthétiser des triméthylamines qui seront convertis en triméthylamine-N-oxyde (TMAO) pouvant entraîner des désordres cardiovasculaires [17].



**Figure 1 – Métabolites issus du microbiote digestif ou co-métabolome et leurs fonctions**

Des relations étroites ont été démontrées entre la dysbiose (perturbations du microbiote) et la survenue de nombreuses pathologies (pathologies cardio-vasculaires, diabète, asthme, cancers) [7,18]. L'incidence de l'hypertension artérielle chez les patients transplantés est augmentée de plus de 50% en fonction de l'organe transplanté, et augmente le risque de rejet du greffon [19,20]. Des études suggèrent que le microbiote digestif joue un rôle essentiel dans la régulation de la pression artérielle [21]. En effet, la composition microbienne est retrouvée altérée chez des patients présentant une hypertension artérielle [22,23]. Le diabète post-transplantation est également l'une des co-morbidités les plus courantes après une transplantation d'organe dont l'incidence varie en fonction de l'organe transplanté de 10 à 40% [24]. Des altérations dans la composition du microbiote intestinal sont retrouvées chez des patients diabétiques montrant le rôle de ce microbiote dans la physiopathologie du diabète [25,26]. Enfin, l'altération de la barrière épithéliale intestinale ainsi qu'une endotoxémie, résultant d'une dysbiose, ont été mises en évidence dans un modèle pré-clinique de diabète ainsi que chez des patients souffrant de désordres cardiovasculaires [27,28]. Ce microbiote représenterait donc, une cible intéressante pour optimiser d'une part la tolérance immunitaire chez les patients transplantés et d'autre part pour la prise en charge des co-morbidités ainsi que la survie du greffon.

Cela nous questionne sur le rôle du microbiote digestif et de l'intégrité de la barrière épithéliale digestive dans l'immunomodulation au cours de la transplantation d'organes. Les objectifs de cette thèse sont donc de comprendre les altérations de la barrière intestinale lors d'un traitement immunosuppresseur ainsi que d'étudier les effets immunomodulateurs des produits du microbiote digestif. À la suite de cette introduction générale, nous présenterons dans un premier chapitre, quelques arguments bibliographiques sur l'implication du microbiote digestif en transplantation. Un deuxième chapitre sera consacré à la présentation des travaux réalisés au cours de cette thèse pour évaluer l'impact du protocole d'immunosuppression sur l'homéostasie de la barrière intestinale et du microbiote digestif. Un troisième chapitre abordera l'étude du co-métabolome et plus précisément des acides gras à chaîne courte dans la tolérance immunitaire et la survie du greffon. Un quatrième chapitre sera consacré aux perspectives qui découlent de nos observations en vue d'une médecine de précision en transplantation.

## **Overview on graft rejection mechanisms and potential immunomodulatory properties of gut microbiota-derived short-chain fatty acids**

Jardou Manon<sup>1</sup>, Brossier Clarisse<sup>1</sup>, Marquet Pierre<sup>1</sup>, Picard Nicolas<sup>1</sup>, Lawson Roland<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Univ. Limoges, Pharmacology & Transplantation, U1248, F-87000 Limoges, France

### **Correspondance**

Lawson Roland

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France

Tel +33 5 19 56 42 51

Email: roland.lawson@unilim.fr

## **Abstract**

Transplantation is the treatment of choice for end-stage failure of several organs since it could considerably improve patients' survival and quality of life. However, graft maintenance requires a complex and life-long immunosuppressive strategy. Immunosuppressive protocols have been linked to alterations of the gut microbiome affecting short-chain fatty acids (SCFA) production. SCFA play a key immunomodulatory role in normal conditions and their impairment in transplant patients could affect the immune system homeostasis and activate deleterious pathways leading to graft rejection. Herein, we detailed the mechanisms of graft rejection and alterations of gut microbiota in transplant patients and depicted the potential role of gut microbiota-derived SCFA as pro-resolving mediators in graft rejection. Modulation of the gut microbiota appears as a potential therapeutic opportunity for improving graft maintenance.



## Introduction

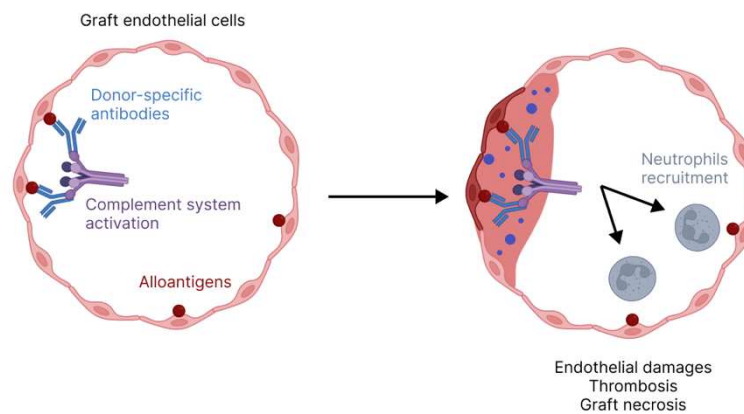
Transplantation is the treatment of choice for end-stage failure of several organs. In 2020, according to the Global Observatory on Donation and Transplantation, kidneys were the most common transplanted organ worldwide with more than 60% of transplant recipients followed by liver with 25% [1]. Organ transplantation improves not only patients survival but also their quality of life [2,3]. Over the past 40 years, graft survival rate following solid organ transplantation have improved considerably due to advances in immunosuppressive therapy. In fact, short-term graft survival has improved significantly and was estimated around 91% at one-year post-transplantation in 2021 [4]. However, the long-term survival rate has not benefited from the same impressive improvement, with a ten-year survival rate of 78% [5]. Indeed, post-transplant recipients are subjected to episodes of rejection that can lead to graft loss. In the context of precision medicine in transplantation, it is important to control the factors that contribute to variability in the therapeutic response to immunosuppressants. Recent advances in the study of the digestive microbiota have highlighted the fundamental role played by this microbiota in regulating the immune system [6].

## Overview on graft rejection mechanisms

Both innate and adaptive immune systems play critical roles in allograft rejection [7]. Several types of rejection processes are described depending on histopathology and immunological characteristics as well as the time course of rejection [8]. Main actors involved in episodes of graft rejection are polynuclear cells, T and B lymphocytes and cytokines [7]. This review will present an overview on the major types of rejection including hyperacute, acute, and chronic rejections.

## Hyperacute rejection

The hyperacute rejection episode occurs in the first minutes to hours after transplantation and is due to a preformed antibody that reacts with alloantigen (*e.g.*, ABO blood type antigens, human leukocyte antigens) leading to accumulation in capillaries and thus to endothelial damage and capillary thrombosis [9]. Indeed, anti-donor antibodies pre-existing in the recipient, induce complement system activation and leads to graft necrosis, thrombosis and ischemia [10] (**Figure 1**). Nowadays, this type of graft rejection is a very rare event due to a prior examination of the tissue compatibility of the donor and the recipient [11].



**Figure 1 – Hyperacute rejection mechanism**

Donor-specific antibodies (DSAs) present on the endothelial cells of the grafted organ vessels induce complement system activation. Neutrophils are also recruited through alloantigens in endothelial cells. All these processes could contribute to endothelial damage, thrombosis, and graft necrosis. Arrows show neutrophil activation.

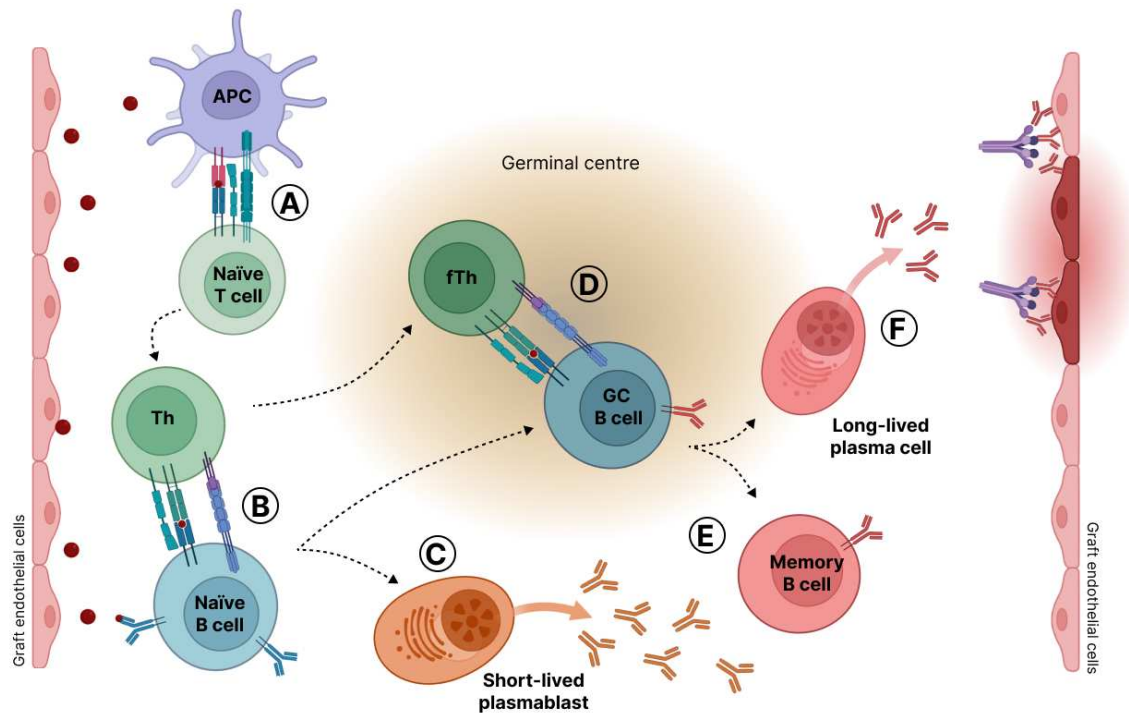
## Acute rejection

During the first weeks or months after transplantation, the graft can undergo acute rejection episodes. Acute graft rejection relies on two distinct mechanisms: a B-cell dependent pathway that represents the antibody mediated rejection (ABMR) also known as humoral response referring to the microvascular inflammation following B-cell activation, plasma cell differentiation and antibodies production targeting donor endothelium; and/or a T-cell dependent pathway that corresponds to T-cell mediated rejection (TCMR) referring to tubulointerstitial inflammation following T-cell activation and migration into the allograft [8,12]. For kidney transplants, ABMR and TCMR are diagnosed on histological analysis of a graft biopsy according to an international classification system, the Banff classification, the latest meeting report was in 2019 [9,12].

### *Antibody mediated rejection (ABMR)*

For ABMR, 3 criteria must be met for diagnosis including histologic evidence of acute injury, evidence of current or recent antibody interaction with vascular endothelium and serologic evidence of circulating donor-specific antibodies (DSAs) [12]. During ABMR, alloantigens from damaged allograft tissue activate antigen-presenting cells (APCs) which in turn present antigens to activate naïve T lymphocytes through major histocompatibility complex (MHC) recognition [13]. Thus, as helper T lymphocyte (Th), they provide a co-stimulatory signal to activate naïve B lymphocytes. These B-cells can also cognate alloantigens through their B-cell receptor (BCR) [14]. Activated B-cells either differentiate in short-lived plasmablasts that produce low-affinity antibodies or migrate into the germinal centre

(GC). Through follicular Th (fTh) and co-stimulation, B-cells undergo somatic hypermutation (variable region of immunoglobulin genes), immunoglobulin class switching as well as memory and long-lived plasma cell generation that secrete high-affinity antibodies [15]. Generate DSAs target graft endothelium and induce tissue-damaging, complement activation as well as neutrophil recruitment (**Figure 2**) [16,17].



**Figure 2 – Antibody mediated rejection mechanism**

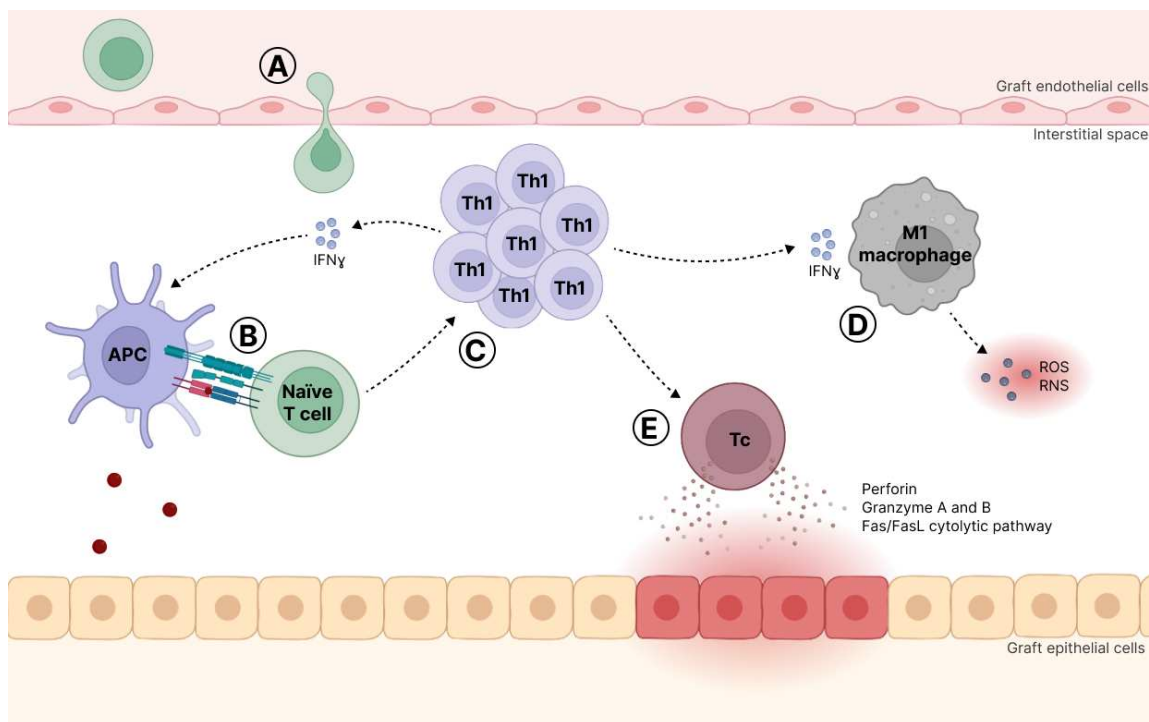
(A) Alloantigens from damaged allograft tissue, activate APCs which in turn present antigens to activate naïve T lymphocytes through MHC recognition. (B) Naïve T lymphocyte differentiate into Th lymphocyte and present the co-stimulatory signal to activate naïve B lymphocytes. Activated B-cells either differentiate in short-lived plasmablasts that produce low-affinity antibodies (C) or migrate into the germinal centre (D). Through fTh and co-stimulation, B lymphocytes undergo somatic hypermutation, immunoglobulin class switching and memory (E) and long-lived plasma cell generation that secrete high-affinity antibodies against graft endothelial cells (F).

APCs, antigen-presenting cells; MHC, major histocompatibility complex; Th, helper T lymphocyte; fTh, follicular T helper.

### *T-cell mediated rejection (TCMR)*

Pathologically, TCMR is characterized by the accumulation of mononuclear cells, mostly Th and cytotoxic T lymphocytes (Tc), in the interstitial space leading to interstitial inflammation combined with inflammation of the tubules and the arteries [12]. For TCMR, lymphocytes infiltrate and proliferate into the interstitial space and these lymphocytes can induce cytotoxic effects on graft epithelial cells thus causing inflammation of tubules. Moreover, lymphocytes can infiltrate arteries and therefore leading to inflammation and blood necrosis [18]. During TCMR, naïve T cells could infiltrate the interstitial space to be activated by APCs, which present alloantigens through MHC recognition. Afterwards, these T-cells proliferate and

differentiate in type 1 Th (Th1) and produce interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), a pro-inflammatory cytokine, that activates APCs [19]. IFN $\gamma$  promotes macrophage recruitment and their polarization in a proinflammatory phenotype (M1). M1 Macrophages secrete abundant amount of proinflammatory cytokines (*i.e.*, interleukin (IL)-1, IL-12, IL-6), tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), and IFN $\gamma$  [20,21]. Thus, macrophages play also a role in antigen presentation through MHC expression on their surface and release reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species to impair graft function and intensify TCMR [22]. Moreover, Th1 promotes Tc differentiation that may cause apoptosis by releasing cytolytic granules containing perforin, granzyme A and B and by inducing Fas/FasL cytolytic pathway [18,23] (**Figure 3**).



**Figure 3 – T-cell mediated rejection mechanism**

(A) Naïve T lymphocytes infiltrate the interstitial space to be (B) activated by APCs, which presents alloantigens through MHC recognition. (C) These T lymphocytes proliferate and differentiate into Th1 and produce IFN $\gamma$ , a pro-inflammatory cytokine that activates APCs. (D) IFN $\gamma$  promotes macrophage recruitment and their polarization in a proinflammatory phenotype (M1) that secrete abundant amount of proinflammatory molecules as well as ROS and RNS. (E) Th1 also promotes Tc differentiation that may cause apoptosis by releasing cytolytic granules.

APCs, antigen-presenting cells; MHC, major histocompatibility complex; Th1, type 1 T helper; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species, Tc, cytotoxic T lymphocyte.

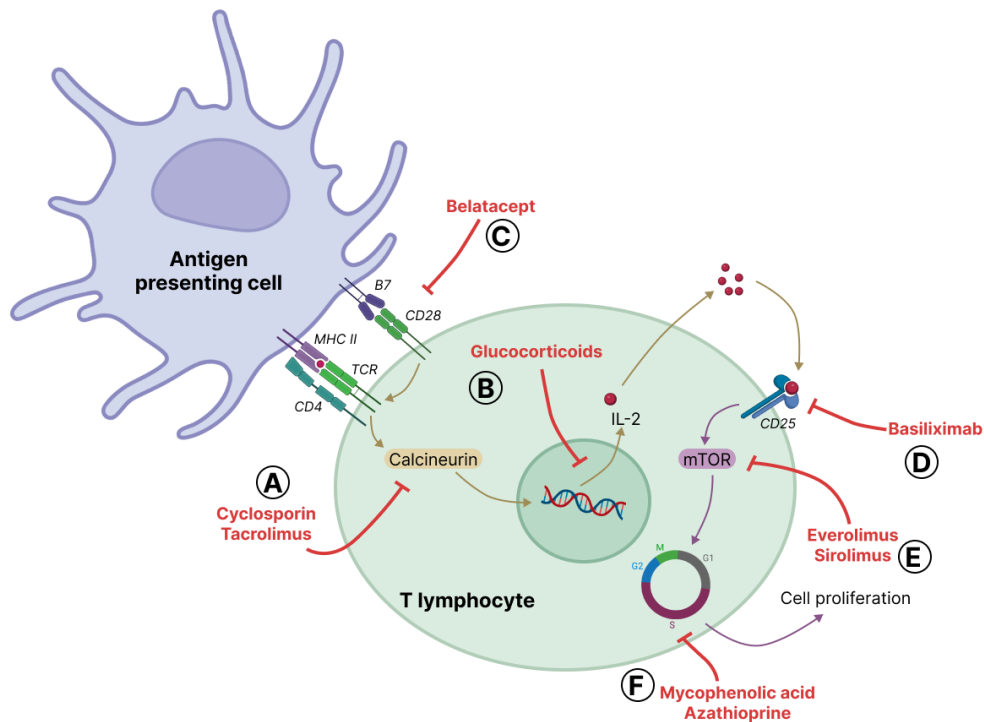
## Chronic rejection

Unlike acute rejection, which occurs rapidly after transplantation, chronic rejection develops slowly and progressively over a period of several months or years and is the major cause of long-term graft loss [8]. According to the Banff classification, characteristic lesions of

chronic rejection are constituted by evidence of chronic injury (e.g., transplant glomerulopathy, arterial intima fibrosis), antibody action (e.g., C4d) and antibody reactive to the donor in the circulation [12,18,24]. The underlying mechanisms of chronic rejection are complex and involve both adaptive and innate immune responses, as well as failure to maintain sufficient immunosuppression and other factors (e.g., age, overweight, hypertension) [25]. This type of rejection can either be chronic ABMR mainly related to the presence of DSA, or chronic TCMR, which is less common [7].

### **Immunosuppressive therapy to manage graft rejection**

Immunosuppressive drugs are used to mitigate this immune response in solid organ transplantation. The major classes of available immunosuppressive drugs are calcineurin inhibitors (cyclosporine and tacrolimus), glucocorticoids (prednisolone), biological immunosuppressive agents (belatacept and basiliximab), mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors (sirolimus and everolimus) and antiproliferative or antimetabolic agents (azathioprine and mycophenolic acid) (**Figure 4**) [26]. To prevent graft rejection and promote graft tolerance, a multidrug approach is commonly used. There are three phases in immunosuppressive therapy: induction, maintenance, and treatment of rejection episodes. The induction phase serves to eliminate alloreactive lymphocytes following transplantation and includes a combined therapy with a calcineurin inhibitor, an anti-proliferative agent, a glucocorticoid and an anti-lymphocytes antibody. The maintenance phase provides continuous prophylaxis against rejection with different combinations of calcineurin inhibitors, anti-proliferative agents, mTOR inhibitors and anti-lymphocyte antibodies, with or without glucocorticoids [26–30]. The treatment of established graft rejection usually consists of the use of agents directed against T cells with a pulse therapy of glucocorticoids and anti-lymphocyte antibodies and other drugs in the case of acute cellular rejection [31]. This protocol is often supplemented with antibiotic, antiviral and antifungal agents to avoid infections [32].



**Figure 4 – Main immunosuppressive drugs and their sites of action**

The major classes of immunosuppressive drugs available are (A) calcineurin inhibitors (cyclosporine and tacrolimus), (B) glucocorticoids (prednisolone) that inhibit IL-2 biosynthesis, (C and D) biological immunosuppressive agents (belatacept and basiliximab), (E) mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors (sirolimus and everolimus) and (F) antiproliferative or antimetabolic agents (azathioprine and mycophenolic acid).

## Post-transplant complications

The use of these antirejection agents may lead to opportunistic infections, reactivation of latent organisms, and post-surgery complications. The pattern of common infections after solid organ transplantation varies according to the immunosuppressive therapy and the environmental exposure [33–35]. These infections include bacterial (e.g., *Clostridium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus pneumoniae*), viral (e.g., cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, respiratory viruses), and fungal (e.g., *Aspergillus species*, *Candida species*, *Pneumocystis spp.*) species [36,37]. The immune system inhibition may also induce malignancies. Indeed, a population-based study of transplant recipients observed a 2-fold overall increased risk of cancers ranging from non-Hodgkin lymphoma to transplant-related cancer (kidney, liver, and lung) [38]. Furthermore, a recent study showed that kidney transplant recipients are at a higher risk in developing post-transplant lymphoproliferative disorder and renal cell carcinoma in an ultra-long-term survival of over 20 years [39]. Among drug-related adverse effects, tacrolimus has been widely reported to cause acute nephrotoxicity in transplant patients with an overall incidence as high as 44% [40,41]. There is also a large

spectrum of cardiovascular diseases observed after transplantation including heart failure, coronary artery disease, hypertension, and post-transplant diabetes mellitus. Moreover, cyclosporine and sirolimus have been associated with hypertension in a rat model [42]. Immunosuppressive drugs such as corticosteroids, calcineurin and mTOR inhibitors are also related to the onset of post-transplant diabetes mellitus [43–46].

Mycophenolic acid, a widely used immunosuppressant following solid organ transplantation, has been frequently associated with gastro-intestinal disorders such as nausea, vomiting and diarrhoea [47]. Indeed, cell apoptosis and architectural remodelling of lower gastro-intestinal tract are seen in mycophenolic acid-treated patients exhibiting a colitis-like or inflammatory bowel disease-like patterns [48]. Furthermore, the development of an enteric-coated and gastro-resistant formulation of mycophenolic acid also induced gastro-intestinal injuries [49]. In addition, immunosuppressive drugs as well as antimicrobial agents have been widely associated with gut microbiota modifications [50–53]. Herein, we detail the changes occurring in gut microbiota after transplantation and focus on the potential role of gut microbiota metabolites as pro-resolving mediators in graft rejection.

## **Gut microbial community in transplantation**

### **Description of the gut microbiota**

The gut microbiota is composed of a diverse and complex microbial community, which contributes to human health. This community of microorganisms includes bacteria, archaea, viruses and fungi that are distributed throughout the gastro-intestinal tract [54]. Among the bacterial species, four main phyla represent 98% of the gut microbiota in healthy adults (*i.e.*, *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria*) from which *Firmicutes* (60-80%) and *Bacteroides* (15-25%) are the dominant bacterial phyla [6,55]. The diversity of the gut microbiota is continuously modified by various demographic, environmental, clinical, dietary, genetic and medication parameters, as well as disease phenotypes [56–58]. The gut microbiota exerts important effects on host homeostasis including the maintenance of the intestinal barrier integrity, the stimulation and homeostasis of the immune system, the support for the digestion of dietary fibre, and the synthesis of essential vitamins [59–63]. Gut microbiota is also involved in drug metabolism that can lead to the activation, inactivation or toxicity of the molecules [64].

Some divergence in terms of composition and function can occur from the ‘normal’ microbiota composition in lot of pathological conditions such as chronic gastro-intestinal

disease, metabolic disorders, asthma, neurological disorders and carcinogenesis. These modifications are generally termed gut microbiota dysbiosis [65–67].

## **Gut microbiota dysbiosis after solid organ transplantation**

In the field of transplantation medicine, gut microbiota dysbiosis has been associated with pre- and post-transplant complications. Indeed, a study reported alterations in the diversity of the gut microbiota in pre-liver transplant patients linked with multi-drug resistant bacteria that remain the leading cause of morbidity and mortality after liver transplantation [68]. Moreover, changes in bacterial species (*e.g.*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus*) contribute to the progression of end-stage liver disease correlated with the risk of death in patients awaiting liver transplantation [69]. These modifications are also associated with post-transplant survival [70]. In another study, liver transplant patients with TCMR present a lower diversity index in the post-transplant than in the pre-transplant period. At the phylum level, an increase in *Proteobacteria* and *Actinobacteria* and a decrease in *Firmicutes* were observed in TCMR patients [71]. In addition, the gut microbiota of renal transplant recipients is significantly different than healthy people one-year post-transplantation with more *Proteobacteria* and fewer *Actinobacteria*. This study also demonstrates a loss of butyrate-producing bacteria, a short-chain fatty acid produced by the gut microbiota important for host homeostasis [72]. In this context, we herein discuss potential strategies to improve transplant outcomes through immune system modulation. We will focus on the role of short-chain fatty acids (SCFAs), which are gut microbiota metabolites with immunomodulatory properties.

## **Potential role of short-chain fatty acids in resolving the inflammatory pathways associated to graft rejection**

### **Intestinal short-chain fatty acids production**

Members of the gut microbiota are able to generate carbon and energy source from fermentable carbohydrates that resist to the digestion by host metabolic enzymes. This process is termed “prebiosis” [73]. These fermentable carbohydrates are metabolised in the colon by the microbiota via two main pathways: glycolytic (deoxy-hexoses and hexoses such as starch, cellulose, and fructans) and pentose phosphate (pentoses such as xylans and pectins) pathways [74–76]. Mains SCFAs produced by the gut microbiota are acetate (C2), propionate (C3) and butyrate (C4), in an approximate proportion of 60:20:20 respectively [77]. Although they are formate (C1), valerate (C5), caproate (C6) and branched-chain fatty acids

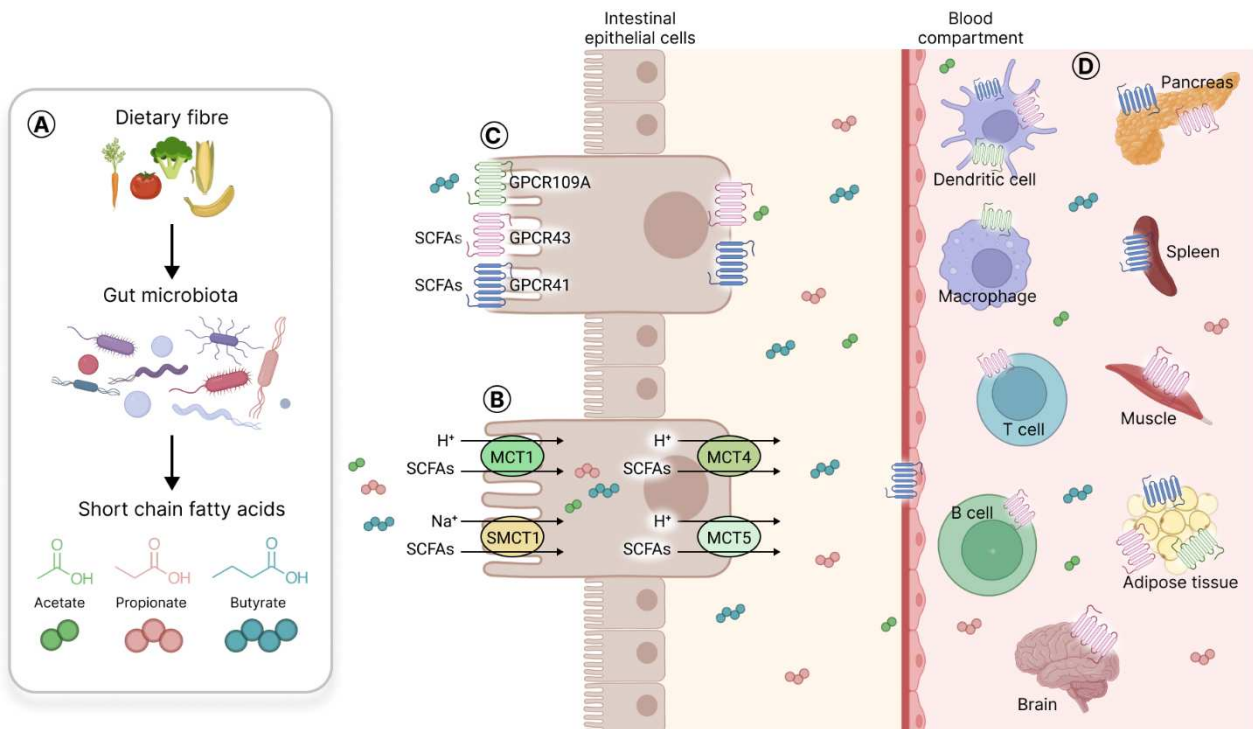


(e.g., isobutyrate, 2-methyl-butyrate, and isovalerate) that can also be produced by the gut microbiota [75,78].

As previously mentioned, Bacteroidetes and Firmicutes are the most abundant phyla in the gastro-intestinal tract. Bacteroidetes and Firmicutes mainly produce acetate and propionate, whereas Firmicutes members mostly produce butyrate in the gut [75,79]. Pathways for the production of acetate are commonly spread among bacteria species and achieved the highest concentrations in the intestine [80]. However, for propionate and butyrate production, specific pathways and substrates have been described. Bacteroidetes and Negativicutes (from Firmicutes phylum) use the succinate pathway whereas Lachnospiraceae (from Firmicutes phylum) uses the propanediol pathway for propionate biosynthesis [81]. Moreover, there are two pathways for butyrate synthesis mediated by key enzymes, butyrate kinase for *Coprococcus eutactus* and *Coprococcus comes* species or butyryl CoA; acetate CoA transferase for *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* and *Roseburia intestinalis* species [74,81].

### **Short-chain fatty acids transporters and receptors**

At the cellular level, SCFAs have direct or indirect effects on cell homeostasis such as proliferation, differentiation, or gene expression [82]. To perform these effects, SCFAs can passively penetrate and pass over the apical membrane of intestinal epithelial cells [83]. SCFAs can also be actively incorporated through sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 (SMCT1) or monocarboxylate transporter 1 (MCT1) located on the apical side of intestinal epithelial cells [84–87]. SCFAs are consumed by colonocytes as a source of energy and provide 6 to 10% of the daily caloric requirements [88]. The remaining are transported over the basolateral membrane into the bloodstream to participate in host homeostasis through monocarboxylate transporter 4 and 5 (MCT4 and MCT5) located on the basolateral side [86,89]. SCFAs are active molecules. They can selectively regulate three different G-protein coupled receptors (GPCR) on intestinal cells, namely, GPR41 (free fatty acid receptor 3 or FFAR3), GPR43 (free fatty acid receptor 2 or FFAR2) and, only for butyrate, GPR109A (hydroxycarboxylic acid receptor 2 or HCAR2) [90–92]. These receptors are also expressed on various other cell types in organs and tissues such as brain, adipose tissue, spleen, muscles, endothelial cells, and some immune cells (*i.e.*, dendritic cells, T and B lymphocytes, macrophages) [93–95] (**Figure 5**).



**Figure 5 – SCFAs production, transporters, and receptors**

(A) Gut microbiota produce SCFAs from fermentable carbohydrates that resist to the digestion of host metabolic enzymes. These fermentable carbohydrates are metabolised in three main SCFAs (*i.e.*, acetate, propionate, butyrate). (B) SCFAs can passively penetrate or can be actively incorporated through SMCT1 or MCT1 located on the apical and MCT4 or MCT5 on the basal side of intestinal epithelial cells. (C) SCFAs can selectively regulate three different GPCR on intestinal cells, namely, GPR41, GPR43 and, only for butyrate, GPR109A. (D) These receptors are also expressed on various other cell types in organs and tissues such as the brain, adipose tissue, spleen, muscles, endothelial cells, and some immune cells.

## Anti-inflammatory properties of short-chain fatty acids

SCFAs produced by the intestinal microbiota have been implicated in the regulation of immune function [6]. **Table 1** presents an overview of the modulation by SCFAs of immune cells involved in graft rejection such as neutrophils, B lymphocytes, T lymphocytes and macrophages.

### Neutrophils

Neutrophils are the first immune cells to respond to an inflammatory site. They can be activated by pathogens to produce cytokines. These cytokines initiate the recruitment and activation of other immune cells, coordinating the overall immune response [96]. In a context of solid organ transplantation, neutrophils are typically the initial leukocyte cells to infiltrate transplanted organs and to orchestrate local inflammation, tissue necrosis, and eventually graft rejection [97,98].

Studies have demonstrated that propionate and butyrate can regulate the production of pro-inflammatory cytokines by neutrophils. In vitro lipopolysaccharides-stimulated neutrophils, propionate and butyrate significantly reduced the production of pro-inflammatory molecules (TNF- $\alpha$  and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 (CINC-2 $\alpha\beta$ )). These two SCFAs could also inhibit nitric oxide production by activated neutrophils [99]. In addition, propionate and butyrate could induce non-activated and activated neutrophils death by caspase-8 and -9 pathways as well as through their histone deacetylase (HDAC) inhibitory activity [100]. Furthermore, butyrate can prevent excessive neutrophils influx into the airways by acting through a GPCR-dependent receptor and by altering the synthesis of chemokine C-X-C motif ligand 1 (CXCL1), which is a macrophage-produced chemoattractant for neutrophils [101]. Moreover, in a mouse model of kidney ischemia and reperfusion injury, acetate protection was associated with low levels of activated neutrophils [102].

### *B lymphocytes*

B lymphocytes play a key role in the humoral immune response and are involved in organ rejection by producing antibodies against donor antigens. Moreover, B-cells can impact the transplanted organs by interacting with T cells. This interaction includes activities such as antigen presentation, cytokine generation, and co-stimulation [103]. Gut microbiota-derived SCFAs may also impact B lymphocytes. Propionate and butyrate treatment lead to the inhibition of class-switch DNA recombination, somatic hypermutation of B lymphocytes and plasma cell differentiation [104]. Moreover, acetate promotes B10 lymphocytes, a subpopulation of B lymphocytes with anti-inflammatory effects [105]. These B10 lymphocytes induce the reduction of pro-inflammatory cytokine production and the decreased expression of MHC and co-stimulatory molecules, leading to a decrease in T cell activation, in innate cells [106,107]. In addition, butyrate may also induce B10 cell differentiation as shown in a mouse model supplemented with this SCFA [108].

### *T lymphocytes*

T lymphocytes are central in the immune response against foreign antigens in transplantation. T lymphocytes recognize antigens presented by APCs and activate effector cells to destroy foreign cells. They are involved in acute and chronic graft rejection, as well as immune tolerance to the graft [109]. SCFAs have been shown to modulate T lymphocyte differentiation through their HDAC inhibitory activity or cellular response after GPCR recognition. In a mouse model of kidney transplantation, acetate and butyrate supplementation prolonged allograft survival by promoting donor-specific tolerance. Moreover, GPR43 was

required to mediate the benefit of acetate supplementation observed in this model of transplantation [110]. In addition, some SCFAs (e.g., butyrate, isovalerate and propionate) produced by commensal microbiota stimulate *in vitro* generation of regulatory T lymphocytes (Tregs) and this was confirmed *in vivo* with extrathymic differentiation of Treg in butyrate-supplemented mouse model [111]. Butyrate seems to be the most pharmacologically active SCFA with an elevated HDAC inhibitory activity to induce Forkhead box P3 (FoxP3, transcription factor of Tregs) expression [112–114]. The potential use of Tregs as an alternative or supplement to immunosuppressive therapies in organ transplantation has been investigated, to reduce rejection and associated adverse effects [115–117].

### *Macrophages*

Macrophages play a significant role in the immune response after transplantation. They are involved in both acute and chronic inflammation as well as graft rejection. Macrophages can also have a beneficial role in promoting immune tolerance to the graft by inducing differentiation of Tregs. Modulating macrophages may offer new treatment strategy to improve transplant outcomes [22]. Mice subjected to kidney ischemia-reperfusion injury and treated with acetate showed a decrease in ROS, mainly produced by macrophages. Moreover, a low frequency of infiltrating macrophages was observed in these acetate-treated mice [102]. Propionate and butyrate can suppress the pro-inflammatory phenotype of macrophages while promoting an anti-inflammatory phenotype that could contribute to the resolution of inflammation [118]. Furthermore, butyrate through its HDAC inhibitory activity can imprint a potent anti-microbial activity during macrophage differentiation [119]. In addition, butyrate promotes anti-inflammatory effects on macrophages by reducing the production of inflammatory mediators (TNF- $\alpha$ , IL-6, inducible nitric oxide synthase) [120]. Similarly, butyrate binds to GPR109A on macrophages and creates an environment rich in IL-10 which boosts Tregs differentiation while suppressing the expansion of pro-inflammatory T lymphocytes (e.g., Th17) [121].

**Table 1. Anti-inflammatory properties of SCFAs**

Target cells	Mediators	Actions	References
Neutrophils	Propionate and butyrate	Reduction of pro-inflammatory cytokines production by neutrophils	[99]
		Induction of neutrophils death through their HDAC inhibitory activity	[100]
	Butyrate	Prevention of excessive neutrophils influx by alteration of chemoattractant synthesis	[101]
	Acetate	Protection against ischemia and reperfusion injury with low levels of activated neutrophils	[102]
B lymphocytes	Propionate and butyrate	Inhibition of class-switch DNA recombination, somatic hypermutation and plasma cell differentiation	[104]
	Acetate and butyrate	Induction of B10 cell differentiation	[105, 108]
T lymphocytes	Acetate and butyrate	Prolongation of allograft survival by promoting donor-specific tolerance	[110]
	Propionate and butyrate	Generation of Tregs <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	[111]
	Butyrate	Elevated HDAC inhibitory activity to induction FoxP3 expression	[112-114]
Macrophages	Propionate and butyrate	Suppression of pro-inflammatory phenotype and promotion of anti-inflammatory phenotype	[118]
	Butyrate	Impression of an anti-microbial activity during macrophage differentiation	[119]
		Reduction of the production of inflammatory mediators by macrophages	[120]
		Binding to GPR109A on macrophages and promotes an IL-10-rich environment which boosts Tregs differentiation	[121]
	Acetate	Reduction in ROS production by macrophages	[102]

HDAC, histone deacetylase; GPR109A, G-protein coupled receptors 109A.

## Conclusion

In solid organ transplantation, graft rejection may occur within hours to years after surgery. This can happen through multiple mechanisms. To manage the risk of graft rejection, patients are life-long treated with immunosuppressive drugs that will dampen their immune systems. These immunosuppressive drugs exhibit serious adverse effects such as diabetes or hypertension that may significantly affect patient adherence to treatment as well as graft outcomes. Mitigating these non-immune adverse effects could also improve graft outcomes, patient duration and quality of life. As discussed, the gut microbiota may play a central role in host homeostasis as well as in immune system modulation. Indeed, SCFAs produced by the gut microbiota can regulate the host cells involved in graft rejection such as neutrophils, B lymphocytes, T lymphocytes and macrophages with anti-inflammatory properties. Further studies are needed to better understand the underlying pharmacological mechanisms of SCFAs. Collectively, these data demonstrate the important function of gut microbiota metabolites in the modulation of the immune system that needs to be taken into account in transplantation. Moreover, gut microbiota metabolites, such as SCFAs, could be used as pro-resolving mediators of graft rejection.

## Disclosure

Authors report no conflicts of interest in this work.

## Abbreviations

ABMR, antibody mediated rejection; APCs, antigen-presenting cells; DSAs, donor-specific antibodies; FoxP3, forkhead box P3; GPCR, G-protein coupled receptors; HDAC, histone deacetylase; IFN $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; MCT, monocarboxylate transporter ; mTOR, mammalian target of rapamycin; MHC, major histocompatibility complex; ROS, reactive oxygen species nitrogen; RNS, reactive nitrogen species; SCFAs, short-chain fatty acids; SMCT, sodium-coupled monocarboxylate transporter; Tc, cytotoxic T lymphocyte; TCMR, T-cell mediated rejection; Th, helper T lymphocyte; Tregs, regulatory T lymphocyte.

## References

1. Home. GODT. Accessed April 28, 2022. <http://www.transplant-observatory.org/>

2. Grinyó JM. Why Is Organ Transplantation Clinically Important? *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(6):a014985. doi:10.1101/cshperspect.a014985
3. Black CK, Termanini KM, Aguirre O, Hawksworth JS, Sosin M. Solid organ transplantation in the 21st century. *Ann Transl Med.* 2018;6(20):409. doi:10.21037/atm.2018.09.68
4. Agence de la biomédecine 2021. Accessed June 23, 2023. <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-dorganes-donnees-generales-et-methodes>
5. Ghelichi-Ghojogh M, Ghaem H, Mohammadzadeh F, et al. Graft and Patient Survival Rates in Kidney Transplantation, and Their Associated Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian Journal of Public Health.* 2021;50(8):1555-1563. doi:10.18502/ijph.v50i8.6801
6. Zhang Z, Tang H, Chen P, Xie H, Tao Y. Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome. *Sig Transduct Target Ther.* 2019;4(1):41. doi:10.1038/s41392-019-0074-5
7. Naik RH, Shawar SH. Renal Transplantation Rejection. In: *StatPearls.* StatPearls Publishing; 2020. Accessed January 8, 2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553074/>
8. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi MC. Effector Mechanisms of Rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(11). doi:10.1101/cshperspect.a015461
9. Solez K i. m., Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International.* 1993;44(2):411-422. doi:10.1038/ki.1993.259
10. Lala A, Joyce E, Groarke JD, Mehra MR. Challenges in Long-Term Mechanical Circulatory Support and Biological Replacement of the Failing Heart. *Circ J.* 2014;78(2):288-299. doi:10.1253/circj.CJ-13-1498
11. Tittelbach-Helmrich D, Bausch D, Drognitz O, et al. Hyperacute Rejection of a Living Unrelated Kidney Graft. *Case Rep Med.* 2014;2014:613641. doi:10.1155/2014/613641
12. Loupy A, Haas M, Roufosse C, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2020;20(9):2318-2331. doi:10.1111/ajt.15898
13. Lee HG, Cho MZ, Choi JM. Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp Mol Med.* 2020;52(8):1255-1263. doi:10.1038/s12276-020-00486-7

14. Matsuda Y, Watanabe T, Li XK. Approaches for Controlling Antibody-Mediated Allograft Rejection Through Targeting B Cells. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:2633. doi:10.3389/fimmu.2021.682334
15. González-Molina M, Ruiz-Esteban P, Caballero A, et al. Immune response and histology of humoral rejection in kidney transplantation. *Nefrologia*. 2016;36(4):354-367. doi:10.1016/j.nefro.2016.03.023
16. Suchanek O, Clatworthy MR. Novel strategies to target the humoral alloimmune response. *HLA*. 2020;96(6):667-680. doi:10.1111/tan.14092
17. Oellerich M, Sherwood K, Keown P, et al. Liquid biopsies: donor-derived cell-free DNA for the detection of kidney allograft injury. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(9):591-603. doi:10.1038/s41581-021-00428-0
18. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2008;3(1):189-220. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151508
19. Eikmans M, Gielis EM, Ledeganck KJ, Yang J, Abramowicz D, Claas FFJ. Non-invasive Biomarkers of Acute Rejection in Kidney Transplantation: Novel Targets and Strategies. *Frontiers in Medicine*. 2019;5. Accessed May 3, 2022. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2018.00358>
20. Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The Role of Macrophages in Allograft Rejection. *Transplantation*. 2005;80(12):1641-1647. doi:10.1097/01.tp.0000173903.26886.20
21. Wang J, Li R, Peng Z, Hu B, Rao X, Li J. HMGB1 participates in LPS-induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophages and inducing polarization of M1 macrophages via TLR2, TLR4, and RAGE/NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2020;45(1):61-80. doi:10.3892/ijmm.2019.4402
22. Panzer SE. Macrophages in Transplantation: A Matter of Plasticity, Polarization, and Diversity. *Transplantation*. 2022;106(2):257-267. doi:10.1097/TP.0000000000003804
23. Robertson H, Wheeler J, Kirby JA, Morley AR. Renal allograft rejection--in situ demonstration of cytotoxic intratubular cells. *Transplantation*. 1996;61(10):1546-1549. doi:10.1097/00007890-199605270-00023
24. Colvin RB. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(4):1046. doi:10.1681/ASN.2007010073



25. Joosten SA, Sijpkens YWJ, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 2005;68(1):1-13. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00376.x
26. Wiesner RH, Fung JJ. Present state of immunosuppressive therapy in liver transplant recipients. *Liver Transplantation.* 2011;17(S3):S1-S9. doi:10.1002/lt.22410
27. Claeys E, Vermeire K. Immunosuppressive drugs in organ transplantation to prevent allograft rejection: Mode of action and side effects. *J Immunological Sci.* 2019;3(4):14-21. doi:10.29245/2578-3009/2019/4.1178
28. Enderby C, Keller CA. An overview of immunosuppression in solid organ transplantation. *Am J Manag Care.* 2015;21(1 Suppl):s12-23.
29. Fuehner T, Benden C, Gottlieb J. Initial immunosuppression and managing rejection. *Intensive Care Med.* 2019;45(3):388-390. doi:10.1007/s00134-018-05515-8
30. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Immunosuppressive Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2013;3(9):a015487-a015487. doi:10.1101/cshperspect.a015487
31. Cooper JE. Evaluation and Treatment of Acute Rejection in Kidney Allografts. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(3):430-438. doi:10.2215/CJN.11991019
32. Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 2007;357(25):2601-2614. doi:10.1056/NEJMra064928
33. Fishman JA. Infection in Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2017;17(4):856-879. doi:10.1111/ajt.14208
34. Singh N, Limaye AP. Infections in Solid-Organ Transplant Recipients. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* Published online 2015:3440-3452. doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00313-1
35. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(1):86-124.
36. Karuthu S, Blumberg EA. Common Infections in Kidney Transplant Recipients. *CJASN.* 2012;7(12):2058-2070. doi:10.2215/CJN.04410512
37. van Delden C, Stampf S, Hirsch HH, et al. Burden and Timeline of Infectious Diseases in the First Year After Solid Organ Transplantation in the Swiss Transplant Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 2020;71(7):e159-e169. doi:10.1093/cid/ciz1113

38. Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, et al. Spectrum of Cancer Risk Among US Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA*. 2011;306(17):1891-1901. doi:10.1001/jama.2011.1592
39. Fuhrmann JD, Valkova K, von Moos S, Wüthrich RP, Müller TF, Schachtner T. Cancer among kidney transplant recipients >20 years after transplantation: post-transplant lymphoproliferative disorder remains the most common cancer type in the ultra long-term. *Clinical Kidney Journal*. 2022;15(6):1152-1159. doi:10.1093/ckj/sfac013
40. Griffin SP, Nelson JE. Impact of a Clinical Solid Organ Transplant Pharmacist on Tacrolimus Nephrotoxicity, Therapeutic Drug Monitoring, and Institutional Revenue Generation in Adult Kidney Transplant Recipients. *Prog Transpl*. 2016;26(4):314-321. doi:10.1177/1526924816667950
41. Randhawa PS, Starzl TE, Demetris AJ. Tacrolimus (FK506)-Associated Renal Pathology. *Adv Anat Pathol*. 1997;4(4):265-276.
42. Reis F, Parada B, Teixeira de Lemos E, et al. Hypertension Induced by Immunosuppressive Drugs: A Comparative Analysis Between Sirolimus and Cyclosporine. *Transplantation Proceedings*. 2009;41(3):868-873. doi:10.1016/j.transproceed.2009.02.005
43. Faucher Q, Jardou M, Brossier C, Picard N, Marquet P, Lawson R. Is Intestinal Dysbiosis-Associated With Immunosuppressive Therapy a Key Factor in the Pathophysiology of Post-Transplant Diabetes Mellitus? *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13. doi:10.3389/fendo.2022.898878
44. Rysz J, Franczyk B, Radek M, Ciałkowska-Rysz A, Gluba-Brzózka A. Diabetes and Cardiovascular Risk in Renal Transplant Patients. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3422. doi:10.3390/ijms22073422
45. Driscoll CJ, Cashion AK, Hathaway DK, et al. Posttransplant diabetes mellitus in liver transplant recipients. *Prog Transplant*. 2006;16(2):110-116.
46. Chen T, Jia H, Li J, Chen X, Zhou H, Tian H. New onset diabetes mellitus after liver transplantation and hepatitis C virus infection: meta-analysis of clinical studies. *Transpl Int*. 2009;22(4):408-415. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00804.x
47. Al-Absi AI, Cooke CR, Wall BM, Sylvestre P, Ismail MK, Mya M. Patterns of Injury in Mycophenolate Mofetil-Related Colitis. *Transplantation Proceedings*. 2010;42(9):3591-3593. doi:10.1016/j.transproceed.2010.08.066
48. Selbst MK, Ahrens WA, Robert ME, Friedman A, Proctor DD, Jain D. Spectrum of histologic changes in colonic biopsies in patients treated with mycophenolate mofetil. *Mod Pathol*. 2009;22(6):737-743. doi:10.1038/modpathol.2009.44

49. Nguyen T, Park JY, Scudiere JR, Montgomery E. Mycophenolic acid (cellcept and myofortic) induced injury of the upper GI tract. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(9):1355-1363. doi:10.1097/PAS.0b013e3181a755bd
50. Gabarre P, Loens C, Tamzali Y, Barrou B, Jaisser F, Turret J. Immunosuppressive therapy after solid organ transplantation and the gut microbiota: Bidirectional interactions with clinical consequences. *American J Transplantation*. 2022;22(4):1014-1030. doi:10.1111/ajt.16836
51. Taylor MR, Flannigan KL, Rahim H, et al. Vancomycin relieves mycophenolate mofetil–induced gastrointestinal toxicity by eliminating gut bacterial  $\beta$ -glucuronidase activity. *Sci Adv*. 2019;5(8). doi:10.1126/sciadv.aax2358
52. Wu T, Yang L, Jiang J, et al. Chronic glucocorticoid treatment induced circadian clock disorder leads to lipid metabolism and gut microbiota alterations in rats. *Life Sci*. 2018;192:173-182. doi:10.1016/j.lfs.2017.11.049
53. Zhang Z, Liu L, Tang H, et al. Immunosuppressive effect of the gut microbiome altered by high-dose tacrolimus in mice. *Am J Transplant*. 2018;18(7):1646-1656. doi:10.1111/ajt.14661
54. Kho ZY, Lal SK. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9. Accessed August 25, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01835>
55. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-8803. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
56. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*. 2016;352(6285):565-569. doi:10.1126/science.aad3369
57. The Milieu Intérieur Consortium, Scepanovic P, Hodel F, et al. A comprehensive assessment of demographic, environmental, and host genetic associations with gut microbiome diversity in healthy individuals. *Microbiome*. 2019;7(1):130. doi:10.1186/s40168-019-0747-x
58. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352(6285):560-564. doi:10.1126/science.aad3503
59. Okumura R, Takeda K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflammation and Regeneration*. 2018;38(1):5. doi:10.1186/s41232-018-0063-z

60. Yu LCH, Wang JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2012;3(1):27-43. doi:10.4291/wjgp.v3.i1.27
61. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(4):227-238. doi:10.1038/nrmicro2974
62. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*. 2017;5(4):e1373208. doi:10.1080/21688370.2017.1373208
63. Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2012;95(1):50-60. doi:10.5740/jaoacint.SGE\_Macfarlane
64. Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature*. 2019;570(7762):462-467. doi:10.1038/s41586-019-1291-3
65. Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016;22(10):1079-1089. doi:10.1038/nm.4185
66. Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013;6(4):295-308. doi:10.1177/1756283X13482996
67. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1):51. doi:10.1186/s13073-016-0307-y
68. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Macesic N, et al. Colonizing multidrug-resistant bacteria and the longitudinal evolution of the intestinal microbiome after liver transplantation. *Nat Commun*. 2019;10(1):4715. doi:10.1038/s41467-019-12633-4
69. Grał M, Hołowko W, Wronka KM, et al. The relevance of intestinal dysbiosis in liver transplant candidates. *Transpl Infect Dis*. 2015;17(2):174-184. doi:10.1111/tid.12352
70. Györi GP, Silberhumer GR, Zehetmayer S, et al. Dynamic changes in MELD score not only predict survival on the waiting list but also overall survival after liver transplantation. *Transplant International*. 2012;25(9):935-940. doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01519.x
71. Kato K, Nagao M, Miyamoto K, et al. Longitudinal Analysis of the Intestinal Microbiota in Liver Transplantation. *Transplant Direct*. 2017;3(4). doi:10.1097/TXD.0000000000000661

72. Swarte JC, Douwes RM, Hu S, et al. Characteristics and Dysbiosis of the Gut Microbiome in Renal Transplant Recipients. *J Clin Med.* 2020;9(2):386. doi:10.3390/jcm9020386
73. Hugenholtz F, Mullaney JA, Kleerebezem M, Smidt H, Rosendale DI. Modulation of the microbial fermentation in the gut by fermentable carbohydrates. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.* 2013;2(2):133-142. doi:10.1016/j.bcdf.2013.09.008
74. Deleu S, Machiels K, Raes J, Verbeke K, Vermeire S. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? *EBioMedicine.* 2021;66:103293. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103293
75. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* 2003;62(1):67-72. doi:10.1079/PNS2002207
76. Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut.* 1981;22(9):763-779. doi:10.1136/gut.22.9.763
77. Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep.* 2018;7(4):198-206. doi:10.1007/s13668-018-0248-8
78. Heaney LM. Applying mass spectrometry-based assays to explore gut microbial metabolism and associations with disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2020;58(5):719-732. doi:10.1515/cclm-2019-0974
79. He J, Zhang P, Shen L, et al. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6356. doi:10.3390/ijms21176356
80. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology.* 2017;19(1):29-41. doi:10.1111/1462-2920.13589
81. Reichardt N, Duncan SH, Young P, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* 2014;8(6):1323-1335. doi:10.1038/ismej.2014.14
82. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1031-1064. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1031
83. Rechkemmer G, von Engelhardt W. Concentration- and pH-dependence of short-chain fatty acid absorption in the proximal and distal colon of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1988;91(4):659-663. doi:10.1016/0300-9629(88)90944-9

84. Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol.* 2002;539(Pt 2):361-371. doi:10.1113/jphysiol.2001.014241
85. Miyauchi S, Gopal E, Fei YJ, Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13293-13296. doi:10.1074/jbc.C400059200
86. Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, et al. Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(4):C846-852. doi:10.1152/ajpcell.00112.2005
87. Gupta N, Martin PM, Prasad PD, Ganapathy V. SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sciences.* 2006;78(21):2419-2425. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.028
88. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews.* 1990;70(2):567-590. doi:10.1152/physrev.1990.70.2.567
89. Bik EM, Ugalde JA, Cousins J, Goddard AD, Richman J, Apte ZS. Microbial biotransformations in the human distal gut: Microbial biotransformations in the distal gut. *British Journal of Pharmacology.* 2018;175(24):4404-4414. doi:10.1111/bph.14085
90. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11312-11319. doi:10.1074/jbc.M211609200
91. Zhao Y, Chen F, Wu W, et al. GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):752-762. doi:10.1038/mi.2017.118
92. Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, et al. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res.* 2009;69(7):2826-2832. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4466
93. Li X, Watanabe K, Kimura I. Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology.* 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.01882
94. Le Poul E, Loison C, Struyf S, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25481-25489. doi:10.1074/jbc.M301403200

95. van der Hee B, Wells JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology*. Published online March 2021:S0966842X21000354. doi:10.1016/j.tim.2021.02.001
96. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2014;9(1):181-218. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023
97. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MCL, Cooper MA. Neutrophils—A Key Component of Ischemia-Reperfusion Injury. *Shock*. 2013;40(6):463. doi:10.1097/SHK.0000000000000044
98. Scozzi D, Ibrahim M, Menna C, Krupnick AS, Kreisel D, Gelman AE. The Role of Neutrophils in Transplanted Organs. *American Journal of Transplantation*. 2017;17(2):328-335. doi:10.1111/ajt.13940
99. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2011;22(9):849-855. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.07.009
100. Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*. 2010;26(6):653-661. doi:10.1016/j.nut.2009.07.006
101. Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, et al. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c<sup>-</sup> Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8<sup>+</sup> T Cell Metabolism. *Immunity*. 2018;48(5):992-1005.e8. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.022
102. Andrade-Oliveira V, Amano MT, Correa-Costa M, et al. Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion. *JASN*. 2015;26(8):1877-1888. doi:10.1681/ASN.2014030288
103. Schmitz R, Fitch ZW, Schroder PM, et al. B cells in transplant tolerance and rejection: friends or foes? *Transplant International*. 2020;33(1):30-40. doi:10.1111/tri.13549
104. Sanchez HN, Moroney JB, Gan H, et al. B cell-intrinsic epigenetic modulation of antibody responses by dietary fiber-derived short-chain fatty acids. *Nat Commun*. 2020;11(1):60. doi:10.1038/s41467-019-13603-6
105. Daien CI, Tan J, Audo R, et al. Gut-derived acetate promotes B10 cells with antiinflammatory effects. *JCI Insight*. 2021;6(7). doi:10.1172/jci.insight.144156
106. Kalampokis I, Yoshizaki A, Tedder T. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis research & therapy*. 2013;15 Suppl 1:S1. doi:10.1186/ar3907

107. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040-1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016
108. Kim DS, Woo JS, Min HK, et al. Short-chain fatty acid butyrate induces IL-10-producing B cells by regulating circadian-clock-related genes to ameliorate Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2021;119:102611. doi:10.1016/j.jaut.2021.102611
109. Issa F, Schiopu A, Wood KJ. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2010;6(1):155-169. doi:10.1586/eci.09.64
110. Wu H, Singer J, Kwan TK, et al. Gut Microbial Metabolites Induce Donor-Specific Tolerance of Kidney Allografts through Induction of T Regulatory Cells by Short-Chain Fatty Acids. *JASN*. 2020;31(7):1445-1461. doi:10.1681/ASN.2019080852
111. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451-455. doi:10.1038/nature12726
112. Kespohl M, Vachharajani N, Luu M, et al. The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4+ T Cells. *Front Immunol*. 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.01036
113. Verma MS, Fink MJ, Salmon GL, et al. A Common Mechanism Links Activities of Butyrate in the Colon. *ACS Chem Biol*. 2018;13(5):1291-1298. doi:10.1021/acschembio.8b00073
114. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-450. doi:10.1038/nature12721
115. Sánchez-Fueyo A, Whitehouse G, Grageda N, et al. Applicability, safety, and biological activity of regulatory T cell therapy in liver transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2020;20(4):1125-1136. doi:10.1111/ajt.15700
116. Mathew JM, H. -Voss J, LeFever A, et al. A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Sci Rep*. 2018;8(1):7428. doi:10.1038/s41598-018-25574-7
117. Juneja T, Kazmi M, Mellace M, Saidi RF. Utilization of Treg Cells in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2022;13:746889. doi:10.3389/fimmu.2022.746889



118. Wang Z, Zhang X, Zhu L, et al. Inulin alleviates inflammation of alcoholic liver disease via SCFAs-inducing suppression of M1 and facilitation of M2 macrophages in mice. *International Immunopharmacology*. 2020;78:106062. doi:10.1016/j.intimp.2019.106062
119. Schulthess J, Pandey S, Capitani M, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity*. 2019;50(2):432-445.e7. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.018
120. Ohira H, Fujioka Y, Katagiri C, et al. Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(5):425-442. doi:10.5551/jat.15065
121. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, et al. Activation of the receptor (Gpr109a) for niacin and the commensal metabolite butyrate suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014;40(1):128-139. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.007

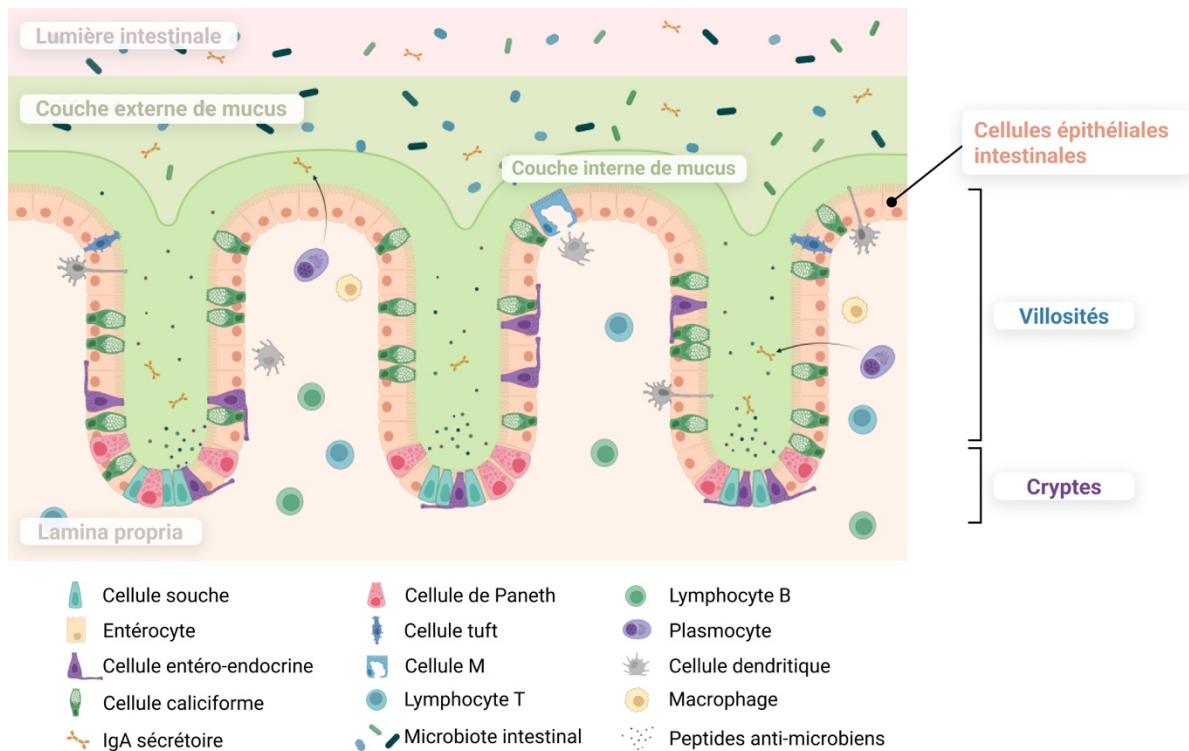
## Chapitre II. Impact du protocole d'immunosuppression sur l'homéostasie de la barrière intestinale

---

Les patients transplantés sont traités à vie par des médicaments anti-rejet (*i.e.*, immunosuppresseurs) qui permettent une modulation du système immunitaire afin d'éviter les épisodes de rejets. Au cours de ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur la toxicité gastro-intestinale de l'acide mycophénolique un immunosuppresseur largement utilisé mais pouvant induire des désordres intestinaux. En effet, l'apparition de ces troubles gastro-intestinaux sont retrouvés fortement liés avec une altération de l'intégrité de la barrière intestinale ainsi qu'une dysbiose du microbiote digestif [29]. La barrière intestinale altérée peut entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale et donc une inflammation chronique systémique de bas grade. Cela conduit au concept selon lequel le syndrome du « *leaky gut* » et la dysbiose sont liés et qu'ils sont tous deux impliqués dans la pathogenèse de divers troubles gastro-intestinaux et systémiques (*i.e.*, maladies chroniques de l'intestin, diabète de type 2, maladies cardiovasculaires) [27,28,30,31].

### II.1. Description de la barrière intestinale

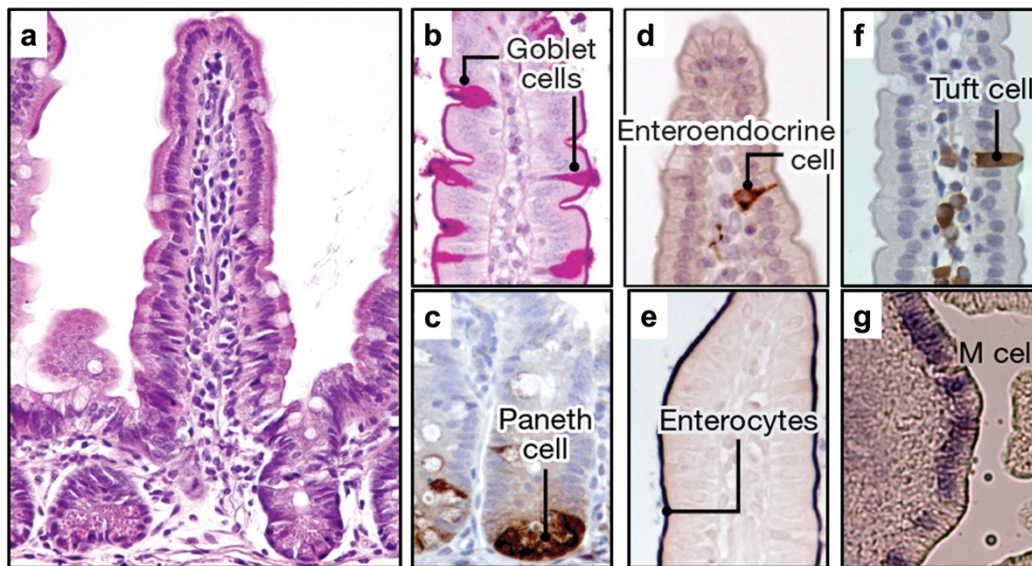
Le corps humain possède de multiples muqueuses formant des barrières entre l'environnement et le milieu intérieur. Parmi ces barrières, celle du tractus gastro-intestinal présente la plus grande surface d'interaction et joue un rôle essentiel dans la régulation et le maintien de l'homéostasie de l'organisme [32]. La muqueuse intestinale est une barrière semi-perméable permettant l'absorption des nutriments, la perception de signaux de défense immunitaire, tout en limitant le transport d'antigènes et de micro-organismes potentiellement nocifs. Ces fonctions sont régies par des composants structurels et moléculaires présents au niveau de la muqueuse intestinale agissant de manière dynamique pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale (**Figure 2**) [33].



**Figure 2 – Composition de la barrière épithéliale intestinale**

### *II.1.1. Les cellules de la barrière intestinale*

L'intestin des mammifères est recouvert d'une seule couche de cellules épithéliales qui se renouvelle tous les 4 à 5 jours. L'intestin est composé de cryptes, qui contiennent des cellules souches intestinales, et de villosités, qui contiennent des types de cellules spécialisées différenciées [34]. Un pool de cellules souches pluripotentes résidant au fond des cryptes donne naissance à 6 types cellulaires avec des fonctions bien distinctes (**Figure 3**) [35].



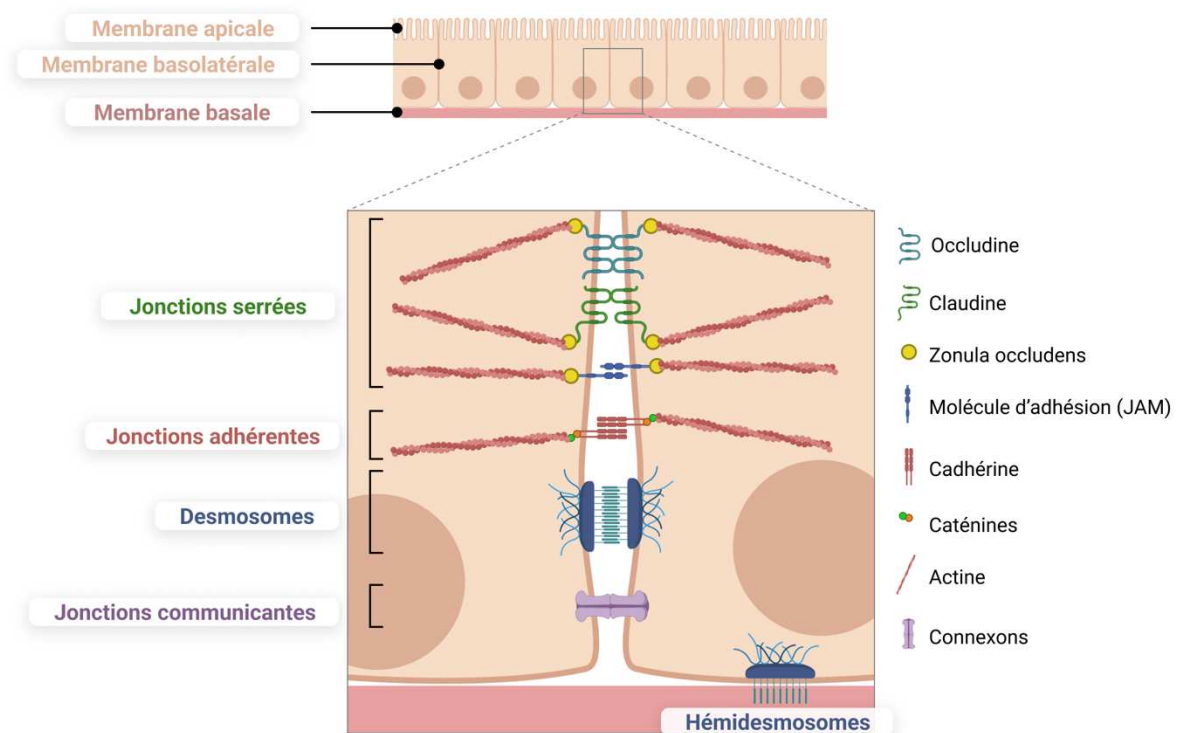
**Figure 3 – Différents types de cellules épithéliales intestinales**

(a) Marquage hématoxyline et éosine de l'épithélium intestinal. (b) Marquage à l'acide periodique de Schiff pour mettre en évidence les cellules caliciformes sécrétant du mucus. (c) Marquage au lysozyme des cellules de Paneth au fond des cryptes. (d) Cellules entéro-endocrines révélées par un marquage à la chromogranine. (e) Marquage de la phosphatase alcaline des entérocytes. (f) Marquage d'une protéine spécifique des cellules Tuft (doublecortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like-1, DCAMKL-1). (g) Marquage du facteur de transcription Spi-B des cellules M.

*Figure issue de Clevers, 2013 [35].*

Les entérocytes sont des cellules hyperpolarisées, participant à l'intégrité de la barrière et à la digestion en assurant l'absorption d'ions, d'eau, de nutriments, de vitamines et de sels biliaires non conjugués [36,37]. La membrane des entérocytes est imperméable à la plupart des solutés hydrophiles en l'absence de transporteurs spécifiques, la voie paracellulaire (entre les cellules) doit donc être scellée pour maintenir l'intégrité de la barrière digestive. Cette propriété est assurée par des complexes jonctionnels, composés des jonctions serrées, des jonctions adhérentes, des desmosomes et des jonctions communicantes [38–40]. Les entérocytes sont également fortement ancrés à la membrane basale grâce à des hémidesmosomes (**Figure 4**). Ces différents complexes protéiques sont liés au cytosquelette des cellules afin de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale [41]. Les cellules caliciformes, présentes à la fois sur les villosités et au fond des cryptes, sont spécialisées dans la synthèse et la sécrétion de mucus [42,43]. Les cellules entéro-endocrines produisent un ensemble d'hormones intestinales qui jouent un rôle dans la coordination de la digestion et l'absorption des aliments, dans la sécrétion d'insuline et la régulation de l'appétit [44]. Les métabolites ou des substances dérivés du microbiote digestif (acides gras à chaîne courte, sels biliaires secondaires, lipopolysaccharides) peuvent également moduler la sécrétion des cellules entéro-endocrines en générant des signaux hormonaux qui reflètent l'apport

alimentaire, la composition microbienne et l'intégrité de l'épithélium [45]. Les cellules Tuft présentes tout le long des cryptes et des villosités sont impliquées dans le métabolisme et l'immunité. Ces cellules surveillent le contenu intestinal luminal à l'aide de récepteurs chimio-sensibles, réagissant ainsi à une large palette de substances et d'agents pathogènes [46,47]. Les cellules de Paneth se positionnent au fond des cryptes et sont connues depuis longtemps pour sécréter des peptides anti-microbiens tels que le lysozyme et les défensines ainsi que des protéines immuno-régulatrices afin de réguler le microbiote digestif [48,49]. Enfin, les cellules M (*microfold cells*) résident dans l'épithélium spécialisé qui recouvre les plaques de Peyer qui sont des tissus lymphoïdes associés au tube digestif jouant un rôle clé dans l'immunité des muqueuses. Ces cellules transportent les antigènes luminaux vers les plaques



**Figure 4 – Complexes jonctionnels des cellules épithéliales intestinales de Peyer afin de déclencher une réponse immunitaire [50,51].**

### II.1.2. Le microbiote digestif

Le tractus gastro-intestinal abrite une communauté microbienne diverse et complexe qui interfère avec différents processus physiologiques de l'organisme. Le microbiote digestif est assimilable à un « organe métabolique » en raison de son impact sur le métabolisme, la physiologie, la nutrition et la fonction immunitaire de l'hôte. Il est désormais évident que le microbiote digestif évolue avec l'hôte qui l'héberge et que les modifications de cette population de micro-organismes peuvent avoir des conséquences majeures, à la fois bénéfiques et

néfastes, sur la santé humaine [52,53]. Du fait de cette relation importante entre l'Homme et ses microbiotes (**Annexe 1**), l'homme pourrait être assimilé à un holobionte dans la quête d'une meilleure connaissance des processus physiopathologiques. Le nombre de micro-organismes présents dans le tube digestif a été estimé à plus de  $10^{14}$ , ce qui représente ~10 fois plus de cellules bactériennes que le nombre de cellules humaines et plus de 100 fois la quantité d'éléments que le génome humain [54]. Les métabolites des bactéries intestinales renforcent aussi directement la fonction de barrière muqueuse des cellules épithéliales intestinales. La sécrétion de mucus par les cellules caliciformes est connue pour être stimulée par le butyrate, l'un des acides gras à chaîne courte produit par les bactéries intestinales [55]. Le butyrate permet également une redistribution des protéines de jonctions serrées impliquées dans l'intégrité de la barrière intestinale [56]. L'indole, un métabolite dérivé du tryptophane provenant de bactéries commensales, renforce l'expression des protéines de jonctions serrées (occludines et claudines) [57].

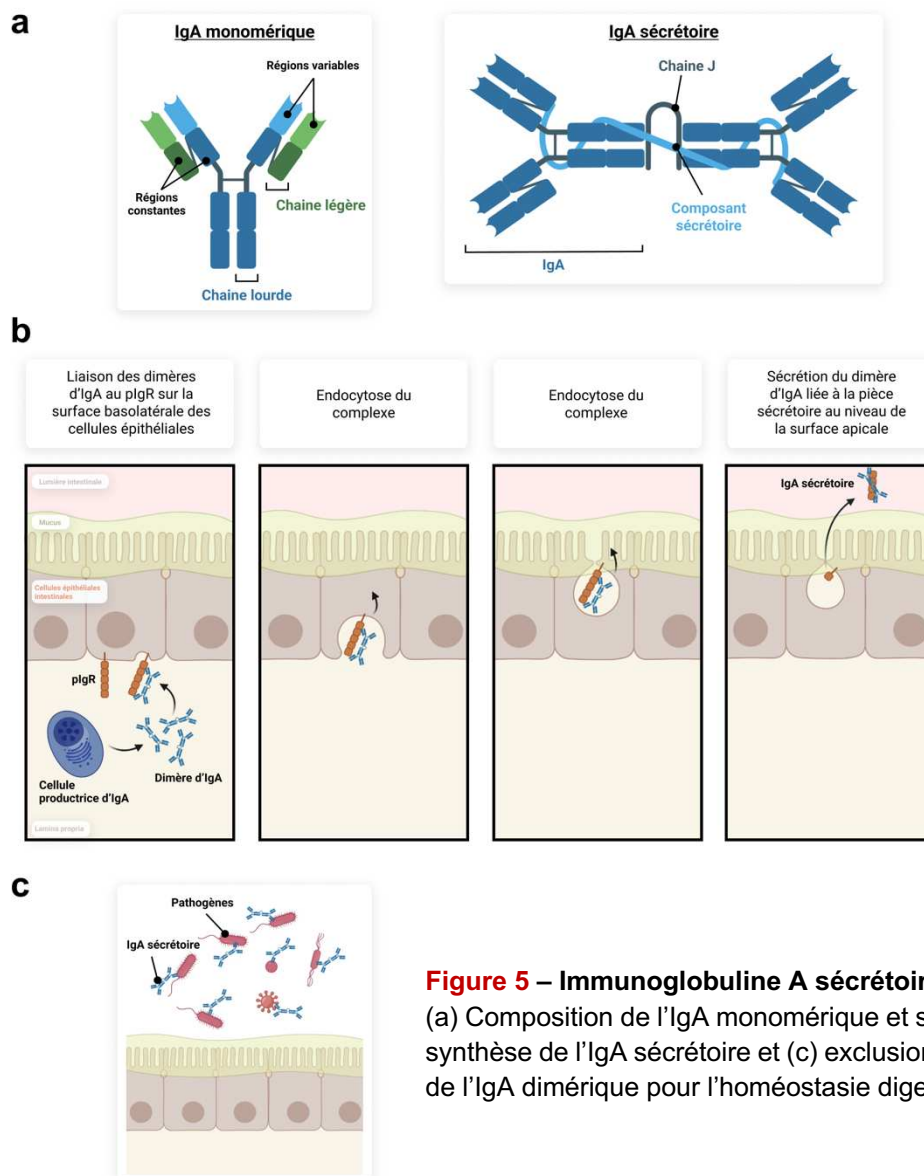
### *II.1.3. Le mucus*

Le tractus gastro-intestinal est recouvert de mucus qui est totalement transparent et invisible au microscope du fait de sa composition en eau de 98%. La couche de mucus est la première ligne de défense contre l'infiltration de micro-organismes, d'enzymes et d'acides digestifs, de particules alimentaires digérées, de sous-produits microbiens et de toxines associées aux aliments [58,59]. L'estomac et le côlon ont un mucus à deux couches avec une couche de mucus interne de 50-200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, fermement attachée à l'épithélium et dépourvue de bactérie. Cette couche interne limite le contact des bactéries avec l'épithélium digestif [60]. La couche externe de mucus s'enlève facilement, présente une bordure externe moins définie et est colonisée par le microbiote digestif. Contrairement au côlon, l'intestin grêle ne possède qu'une seule couche de mucus, qu'il est possible d'enlever par aspiration [61,62]. Le mucus est principalement composé de glycoprotéines ramifiées, dont les mucines, qui interagissent avec l'environnement extérieur et, par leur nature hydrophile, influencent la viscosité du mucus. Plus de 20 sous-types de mucines ont été identifiés chez l'Homme et leur distribution varie dans le tractus gastro-intestinal [63]. Il est bien établi que la principale glycoprotéine de la couche de mucus intestinal est la mucine de type 2 (MUC-2).

### *II.1.4. L'immunoglobuline A sécrétoire*

En tant que classe d'anticorps la plus abondante dans la lumière intestinale de l'Homme et de la plupart des autres mammifères, les immunoglobulines A (IgA) sécrétoires ont

longtemps été reconnues comme protecteurs de l'épithélium intestinal contre les agents pathogènes et les toxines entériques [64]. Contrairement à l'IgA systémique, dans l'intestin l'IgA est produite sous forme d'IgA dimérique par les plasmocytes situés dans la *lamina propria*. La forme dimérique de l'IgA est composée de deux monomères liés par leur portion Fc et d'une protéine appelée chaîne de jonction (J) (**Figure 5a**). L'IgA dimérique produite se lie au récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR) présent à la surface basolatérale des cellules épithéliales. Cela permet la transcytose et la sécrétion des IgA liées au composant sécrétoire par le clivage apical du pIgR (**Figure 5b**) [65]. L'exclusion immunitaire est le principal mécanisme par lequel l'IgA sécrétoire empêche les micro-organismes et les toxines de se lier aux cellules épithéliales. L'IgA sécrétoire peut fixer de multiples épitopes antigéniques à la surface des virus et des bactéries dans la lumière intestinale permettant ainsi l'homéostasie digestive (**Figure 5c**) [66,67].



**Figure 5 – Immunoglobuline A sécrétoire**

(a) Composition de l'IgA monomérique et sécrétoire, (b) synthèse de l'IgA sécrétoire et (c) exclusion immunitaire de l'IgA dimérique pour l'homéostasie digestive.

## II.2. La barrière intestinale lors de l'entéropathie médicamenteuse

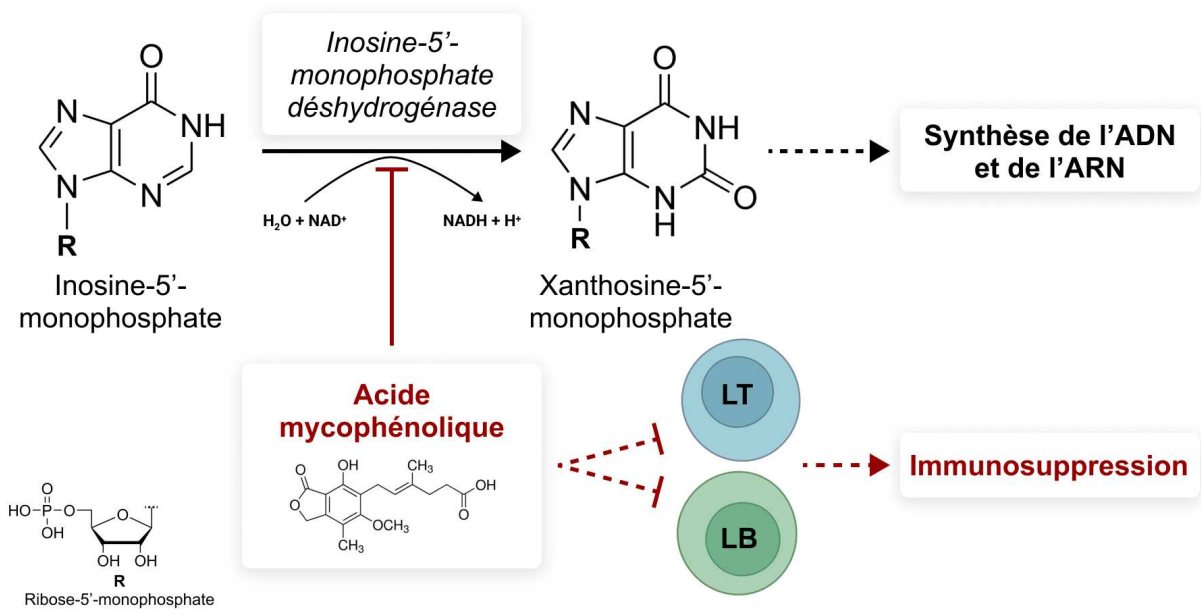
L'homéostasie de la barrière intestinale peut être altérée dans certaines pathologies parmi lesquelles nous retrouvons les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin regroupant entre autres la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces pathologies sont caractérisées par une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal associée à des diarrhées, des douleurs abdominales, des saignements rectaux ainsi qu'une perte de poids [68,69]. Outre ces différentes pathologies, la barrière intestinale peut également être altérée lors de la prise de médicaments, cela définit l'entéropathie médicamenteuse. Plusieurs médicaments administrés par voie orale sont responsables d'effets indésirables gastro-intestinaux. Parmi les différentes classes de médicaments pouvant entraîner une entéropathie, nous retrouvons les anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofénac, ibuprofène) [70–72], les anti-hypertenseurs (olmésartan) [73–75], les agents chimio-thérapeutiques (irinotécan, 5-fluorouracile) [76,77] et les immunosuppresseurs [78]. Parmi les immunosuppresseurs, l'acide mycophénolique entraîne une entéropathie chez environ 30% des patients transplantés [79–81].

La prise de ces médicaments peut provoquer à des stades sévères, une entéropathie caractérisée par des modifications histologiques de la muqueuse gastro-intestinale avec des manifestations cliniques variables. Au départ paucisymptomatique, l'entéropathie est souvent accompagnée de complications graves voire fatales à des stades sévères. La iatrogénie médicamenteuse est un sérieux problème de santé publique [82]. Les symptômes de l'entéropathie médicamenteuse sont sensiblement les mêmes que ceux observés chez les personnes atteintes de maladies inflammatoires et chroniques de l'intestin [83].

## II.3. Le profil pharmacologique de l'acide mycophénolique

L'acide mycophénolique (MPA) est l'un des immunosuppresseurs les plus utilisés dans les transplantations d'organes solides ou de moelle osseuse, ainsi que dans les maladies auto-immunes. Administré sous forme de prodrogue (mycophénolate mofétil, MMF, ester morpholinoéthylrique du MPA) ou de sel sodique (mycophénolate sodium), le MPA est un inhibiteur puissant, sélectif, non compétitif et réversible de l'inosine-5'-monophosphate déshydrogénase 2 (IMPDH2) [84–86]. Cette enzyme joue un rôle fondamental dans la synthèse *de novo* des nucléotides puriques dont dépendent les lymphocytes pour la biosynthèse de l'ADN. Par conséquent, le MPA exerce un effet cytostatique sur les lymphocytes T et B [87–89] (**Figure 6**). Isolé à l'origine comme produit de fermentation du *Penicillium stoloniferum*, le MPA est une molécule à large spectre d'action qui possède des propriétés antifongiques, antibactériennes et antivirales [90,91].

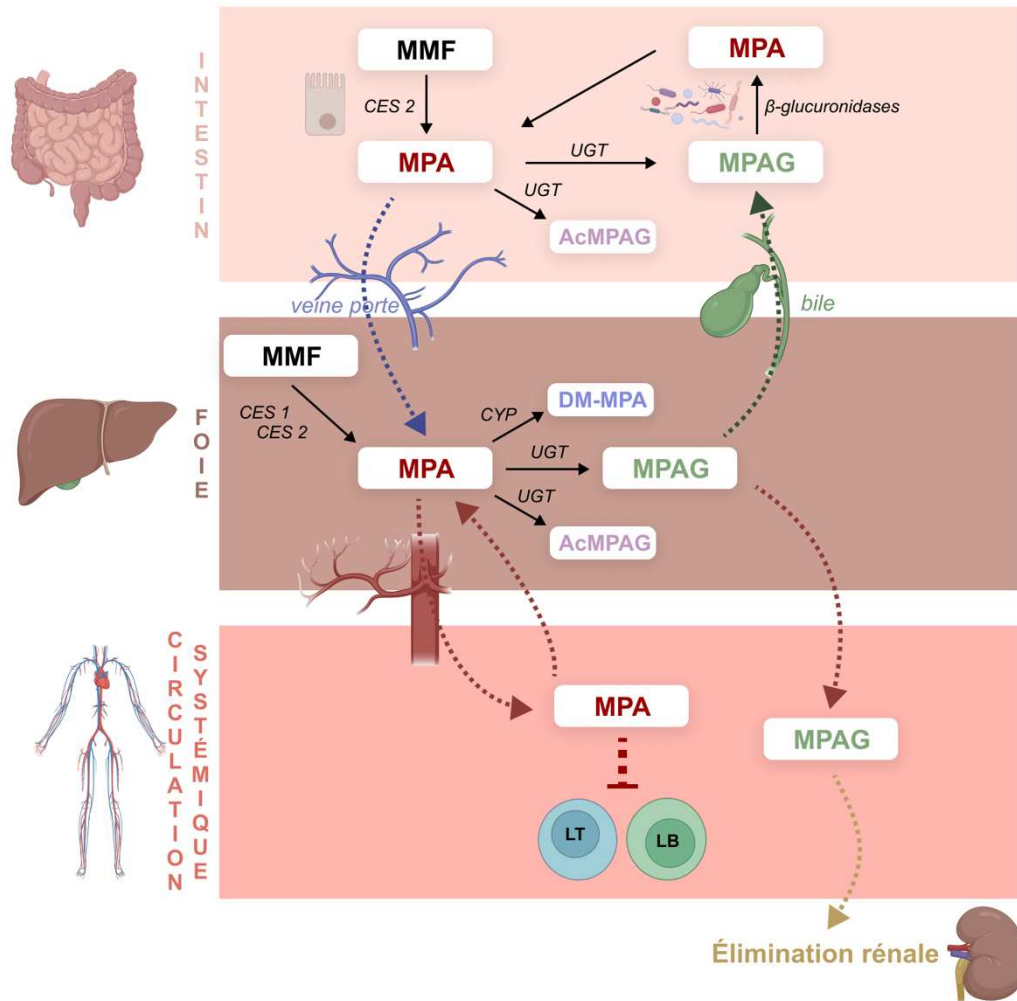




**Figure 6 – Mécanisme d'inhibition de l'acide mycophénolique**

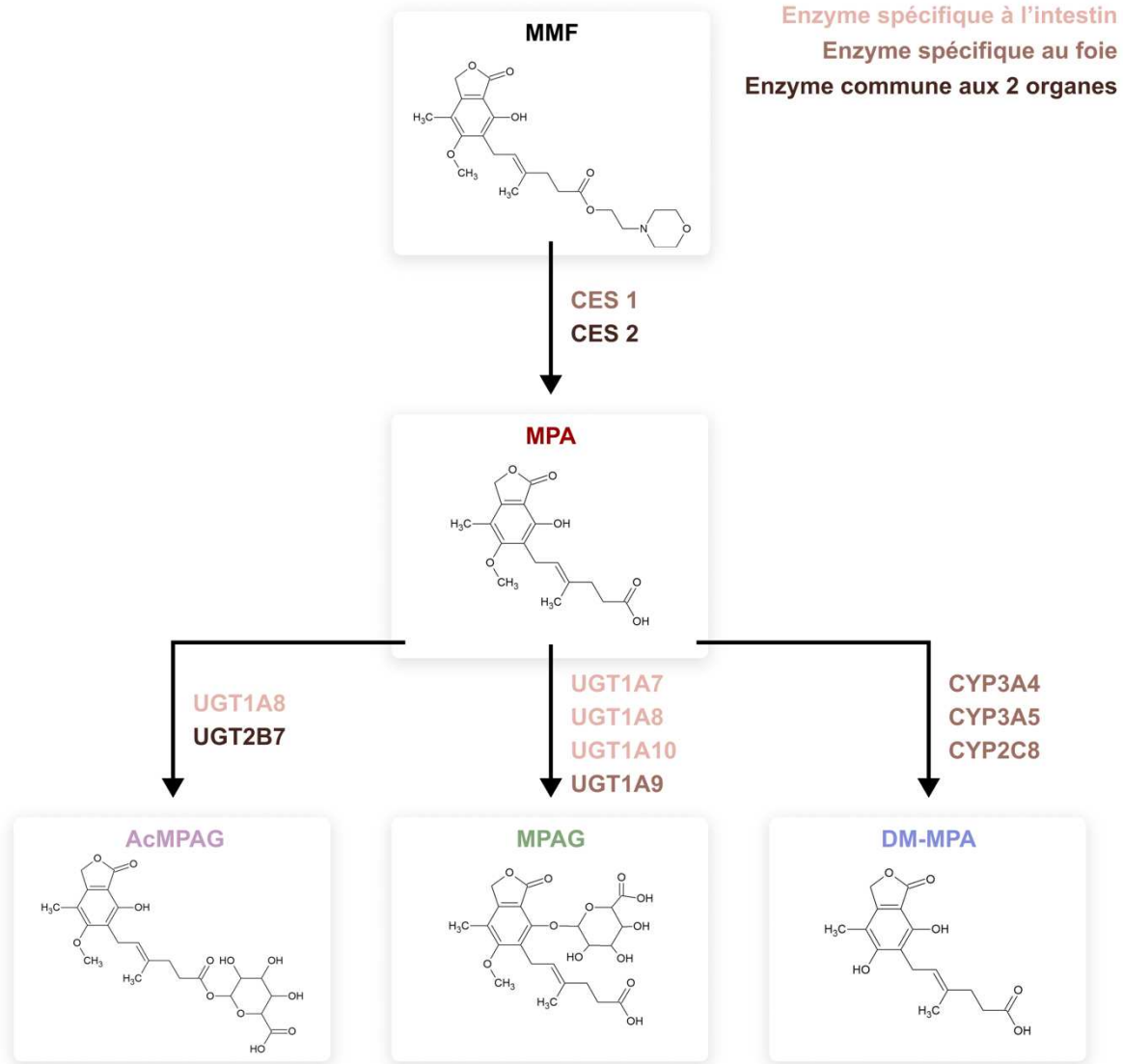
*R*, ribose-5'-monophosphate ; *LT*, lymphocyte T ; *LB*, lymphocyte B.

Les voies métaboliques du MPA ont été bien caractérisées chez les mammifères (**Figure 7 et 8**) [89,92,93]. Le MMF administré par voie orale se retrouve au niveau intestinal où les carboxylestérases de type 2 (CES 2) entraînent la formation de MPA qui est libéré est ainsi absorbé et transporté au foie. Le MMF peut également être transformé au niveau du foie en MPA grâce aux CES 1 et CES 2. Le MPA non métabolisé rejoint la circulation systémique où il va pouvoir exercer son activité d'immunosuppression (**Figure 6 et 7**) [94]. Par la suite, le MPA revient au foie où il sera principalement inactivé en MPAG qui va, en grande majorité, être éliminé par excrétion urinaire et une partie sera évacuée dans la bile [95]. Le MPAG excrété dans la bile interagit avec les bactéries intestinales commensales dans le tractus gastro-intestinal où les  $\beta$ -glucuronidases bactériennes hydrolysent le MPAG en sa forme active, le MPA [96]. Le MPA interagit à son tour avec l'épithélium intestinal et subit une recirculation entéro-hépatique qui contribue à 30-40% de la concentration plasmatique de MPA [91,96–98].



**Figure 7 – Ensemble des voies métaboliques de l'acide mycophénolique**

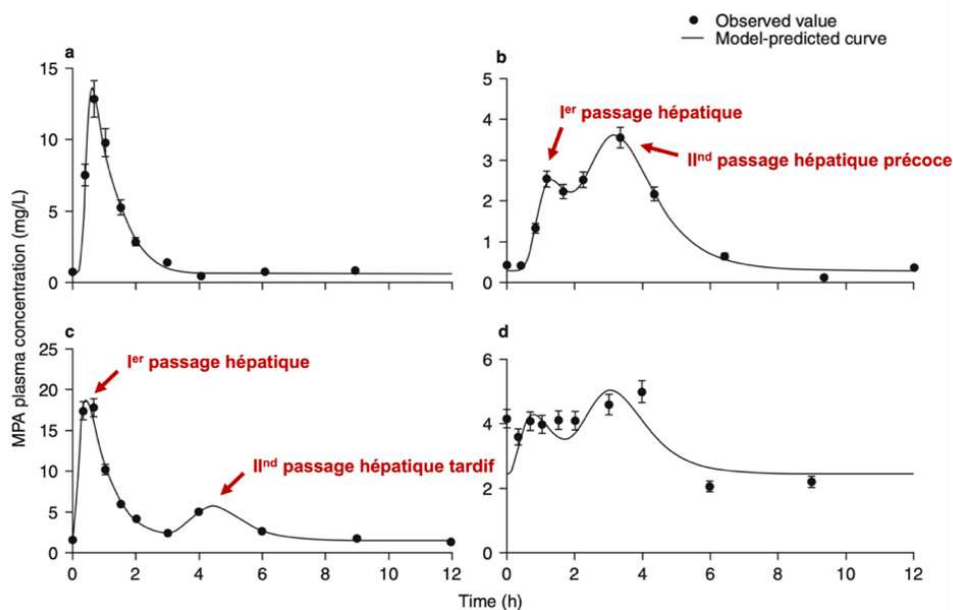
*CES1/2, carboxylestérases de type 1 et 2 ; CYP, cytochromes P450 ; MMF, mycophénolate mofétil ; MPA, acide mycophénolique ; MPAG, MPA 7-O-glucuronide ; AcMPAG, acyl MPAG ; DM-MPA, desméthyl-MPA ; UGT, UDP-glucuronosyltransférases.*



**Figure 8 – Métabolisation du MMF**

*CES*, carboxylestérases ; *CYP*, cytochromes P450 ; *MMF*, mycophénolate mofétil ; *MPA*, acide mycophénolique ; *MPAG*, *MPA-7-O-glucuronide*; *AcMPAG*, acyl *MPAG* ; *DM-MPA*, desméthyl-*MPA* ; *UGT*, *UDP-glucuronosyltransférases*.

La pharmacocinétique du MPA implique donc un effet de premier passage hépatique, qui se traduit par un pic de concentration au niveau systémique, ainsi qu'un second passage hépatique caractérisé par un second pic qui peut être plus ou moins tardif (**Figure 9**) [99].



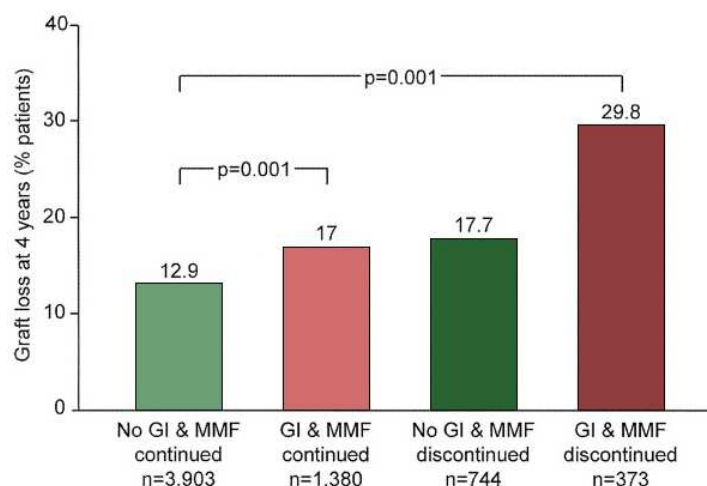
**Figure 9 – Différents types de courbes de concentration plasmatique en fonction du temps du MPA**

Profils observés chez des patients ayant subi une transplantation rénale après l'administration orale de MMF : (a) profil à pic unique, (b) profil à double pic avec un deuxième pic précoce ou (c) tardif, et (d) profil atypique.

Figure issue de Prémaud et al., 2005 [99].

#### II.4. L'entéropathie induite par l'acide mycophénolique

Comme précédemment indiqué, le traitement par MPA peut induire des effets indésirables gastro-intestinaux chez environ 30% des personnes transplantés [79–81]. Ces complications gastro-intestinales associées au traitement par MPA peuvent aller de nausées, vomissements, douleurs abdominales ou des diarrhées à des érosions du tractus gastro-intestinal avec des ulcérations hémorragiques affectant négativement la qualité de vie des patients et augmentent le risque de mauvaise observance du traitement [100,101]. Des études basées sur des patients traités par MMF ont montré que la réduction de la dose, ou l'arrêt du traitement par MPA, a un effet négatif sur le devenir du greffon en augmentant le risque de rejet aigu de l'allogreffe [102,103]. La modification de la dose de MMF au cours de la première année post-transplantation a été corrélée à une aggravation de l'évolution clinique dans une cohorte de patients transplantés rénaux [104]. De plus, des patients présentant des troubles gastro-intestinaux et qui arrêtent leur traitement au MMF ont un risque significativement plus élevé de perte du greffon à 4 ans que des patients qui ne présentent pas de toxicité gastro-intestinale et qui continuent à recevoir le MMF (Figure 10) [105]. Il est évident que les stratégies visant à réduire la toxicité liée au MPA pourraient potentiellement avoir des avantages cliniques marqués améliorant ainsi la qualité de vie des patients traités au MMF.



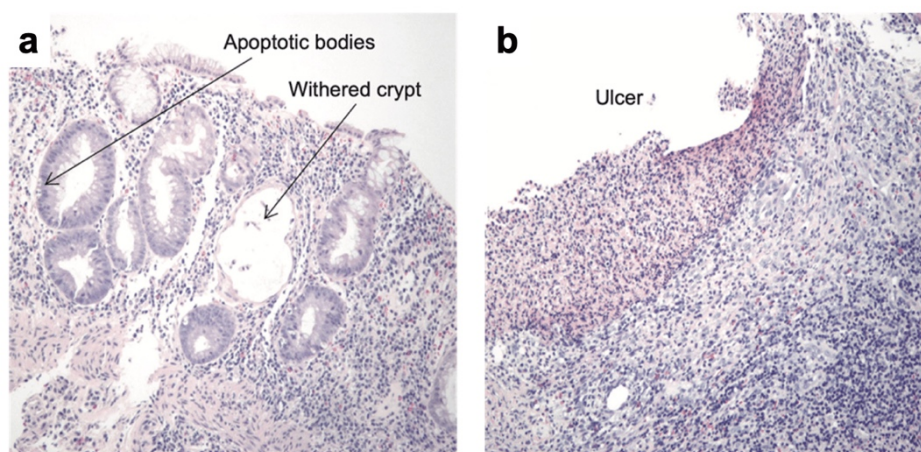
**Figure 10 – Pourcentage de perte du greffon à 4 ans chez des patients transplantés rénaux**

Perte du greffon à 4 ans chez 6400 patients transplantés rénaux avec un greffon fonctionnel à 1 an, stratifiés en fonction de la présence ou de l'absence de complications gastro-intestinales et de la poursuite ou de l'arrêt du mycophénolate mofétil (MMF).

GI, complications gastro-intestinales ; MMF, mycophénolate mofétil.

Figure issue de Arns, 2007 [105].

Au niveau histologique, la toxicité gastro-intestinale du MPA est caractérisée par une désorganisation architecturale de l'épithélium digestif, principalement dans le côlon. Cela peut être associé à un œdème et/ou une inflammation de la *lamina propria*, imitant les lésions inflammatoires de la maladie du greffon contre l'hôte dans les greffes de moelle osseuse (**Figure 11**) [79,106,107].



**Figure 11 – Atteintes histologiques dues au traitement au MMF**

(a) Biopsies de côlons issues de patients transplantés traités au MMF avec des atteintes histologiques telles que des infiltrats lymphocytaires, des cryptes atrophiées, et des corps apoptotiques. (b) Biopsie d'un ulcère avec perte de la muqueuse et avec un dense infiltrat lymphocytaire sous-jacent.

Figure issue de Calmet et al, 2015 [79].

## II.5. Hypothèses mécanistiques de l'entéropathie induite par le MPA

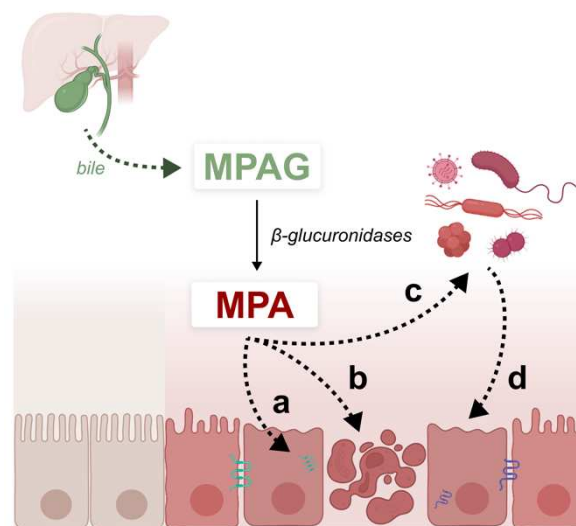
Depuis les années 2005, le suivi thérapeutique pharmacologique du MPA est largement recommandé en raison de sa grande variabilité pharmacocinétique interindividuelle, bien qu'il ne soit pas obligatoire [108]. En effet, pour une dose journalière de MMF de 2g, l'exposition au MPA (aire sous la courbe) peut varier d'un facteur 10 entre des patients [109]. De plus, la pharmacogénétique des UGT intestinales et hépatiques augmente la variabilité de réponse au MPA, mais aucune recherche de polymorphisme génétique n'est actuellement recommandé [110]. De plus, les effets indésirables gastro-intestinaux du MPA sont également responsables de mauvaises adhésions au traitement au MPA de patients transplantés [111]. Actuellement, afin de limiter la variabilité de réponse au MPA, la prise en charge clinique de ces événements gastro-intestinaux constitue un défi majeur dans le domaine de la transplantation. L'étiologie des effets indésirables gastro-intestinaux liés au MPA n'est pas encore totalement comprise et les mécanismes moléculaires sous-jacents ont peu fait l'objet d'études approfondies. Cependant, il existe plusieurs hypothèses concernant l'origine des effets indésirables du MPA sur le tractus gastro-intestinal.

Une hypothèse suggère que le MMF est le médiateur de ces effets indésirables gastro-intestinaux dû à sa rapide libération dans les parties hautes du tube digestif et à son cycle entéro-hépatique important. Cependant, une formulation gastro-résistante du mycophénolate sodique (Myfortic®) a été mise au point afin d'améliorer la tolérance gastro-intestinale, mais elle s'est révélée décevante car elle ne prévient pas suffisamment les effets indésirables gastro-intestinaux [112]. De plus, l'administration intraveineuse de MMF, qui contourne le tractus gastro-intestinal, ne diminue pas non plus l'incidence des effets indésirables gastro-intestinaux [113].

Une deuxième hypothèse met en évidence la contribution de fortes concentrations digestives de MPA au dysfonctionnement de la barrière intestinale. Ces fortes concentrations seraient issues de la déconjugaison du MPAG dans les parties basses du tube digestif en MPA par les  $\beta$ -glucuronidases bactériennes [114]. Bien que le mécanisme sous-jacent ne soit pas très bien connu, il est admis que de fortes concentrations locales de MPA pourraient altérer l'homéostasie des protéines de la jonction serrée et ainsi impacter la perméabilité intestinale. En effet, Qasim *et al.* décrivent une augmentation de la perméabilité épithéliale ainsi qu'une redistribution des protéines de jonction serrée des cellules épithéliales intestinales traitées à de fortes concentrations en MPA [115]. De même, le MPA induit une apoptose des cellules épithéliales intestinales ainsi qu'une destruction de la barrière intestinale dans un modèle murin d'entéropathie induite par le MPA [116].

Une troisième hypothèse met en jeu le microbiote digestif comme acteur central dans l'entéropathie liée au MPA. Des études récentes ont mis en évidence l'altération du microbiome intestinal, également appelée dysbiose intestinale, par le MPA [117]. En effet, la dysbiose intestinale est caractérisée par une expansion des bactéries exprimant la  $\beta$ -glucuronidase entraînant ainsi une hydrolyse du principal métabolite inactif, le MPAG, en MPA [114]. De plus, l'administration de vancomycine, un antibiotique à large spectre, entraîne une diminution significative de MPA fécal et abolit également les lésions gastro-intestinales dans un modèle murin d'entéropathie induite par le MPA [114].

Ces deux dernières hypothèses sont étroitement liées puisque plusieurs études ont évoqué une association possible entre la dysbiose et le dysfonctionnement de la barrière intestinale, qui pourrait entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale (**Figure 12**) [117–119].



**Figure 12** – Hypothèses sur les mécanismes impliqués lors de la toxicité gastro-intestinale du MPA

(a) Redistribution des jonctions serrées, (b) apoptose des cellules épithéliales intestinales, (c) dysbiose du microbiote digestif lors d'un traitement au MPA et (d) altération de la barrière épithéliale intestinale due à la dysbiose.

## II.6. Objectifs

Ce chapitre comprend plusieurs objectifs afin de montrer l'impact du protocole d'immunosuppression sur l'homéostasie de la barrière intestinale.

- (i) Démontrer l'existence d'une perméabilité intestinale chez les patients transplantés traités par le MPA

- (ii) Étudier le profil des acides gras à chaîne courte qui sont connus pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale dans un modèle murin d'entéropathie sévère induite par le MPA
- (iii) Évaluer une stratégie de supplémentation dans un modèle murin d'entéropathie précoce en vue de limiter les atteintes gastro-intestinales.

### **II.7. Travail expérimental 1 : Évaluation de la perméabilité intestinale chez les patients transplantés traités à l'acide mycophénolique basée sur la quantification plasmatique des lipopolysaccharides et des acides gras à chaîne courte**



# **Evaluation of intestinal permeability in mycophenolic acid treated transplant patients based on plasma lipopolysaccharide and short-chain fatty acid quantification**

Jardou Manon<sup>1</sup>, Brossier Clarisse<sup>1</sup>, Humeau Antoine<sup>1</sup>, Pinault Émilie<sup>1</sup>, Sauvage François-Ludovic<sup>1</sup>, Monchaud Caroline<sup>1</sup>, Druilhe Anne<sup>1</sup>, Marquet Pierre<sup>1</sup>, Lawson Roland<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm, Univ. Limoges, CHU Limoges, Pharmacology & Transplantation, F-87000, Limoges, France

## **Correspondance**

Lawson Roland

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France

Tel +33 5 19 56 42 51

Email: [roland.lawson@unilim.fr](mailto:roland.lawson@unilim.fr)

## Abstract

**Purpose:** Mycophenolic acid (MPA) is a drug frequently used as an immunosuppressant in solid organ transplant patients with frequent gastro-intestinal adverse effects. In preclinical models, MPA pathophysiology involves alterations of the intestinal barrier leading to the translocation of lipopolysaccharides (LPS) and bacterial metabolites, short-chain fatty acids (SCFA), of the intestinal lumen to the systemic compartment. The aim of this study is to quantify plasma LPS and SCFA in MPA-treated patients as compared with healthy volunteers and to use these substances to evaluate the severity of intestinal barrier alteration.

**Patients and methods:** Plasma samples from 20 one-year post-transplant adult patients receiving MPA and 20 healthy volunteers were used. Plasma LPS, a known hyperpermeability biomarkers, was measured by enzyme-linked immunosorbent assay and total SCFA, small-size bacterial metabolites, by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Hierarchical agglomerative clustering was applied after principal component analysis.

**Results:** Plasma LPS and total SCFA concentrations were significantly higher in transplant patients than in healthy volunteers. Hierarchical clustering identified 4 distinct groups: cluster A (20 healthy volunteers and 8 transplant patients) with the lowest concentrations of LPS and SCFA, cluster B (7 patients) with a low concentration of LPS but high levels of SCFA, cluster C (4 patient) with high LPS and low SCFA levels, and cluster D (1 patient) with the highest LPS and SCFA concentrations.

**Conclusion:** Our results suggest distinct grades of intestinal permeability: healthy grade in cluster A, early grade characterized by the passage of small-size bacterial metabolites in cluster B, established grade featuring the passage of small and larger (LPS) molecules as in cluster C and advanced grade of intestinal permeability in cluster D. Herein, we highlight the possible role of systemic SCFA as early biomarker of intestinal permeability.

**Keywords:** gut microbiota, mycophenolic acid, adverse effect

## Introduction

Transplantation is the treatment of choice for end-stage failure of several organs since it considerably improves patients' survival and quality of life. However, graft tolerance by the recipient's immune system requires a complex and life-long immunosuppressive strategy, accompanied by other treatments such as antibiotics and antiviral drugs, to mitigate the inherent complications of long-term immunosuppression [1–3]. Immunosuppressive drugs exhibit other serious adverse effects that may significantly influence patients' adherence to treatment as well as graft outcomes [4]. Mitigating these non-immune adverse effects could also improve quality of life, graft outcome and patient survival [5].

Mycophenolic acid (MPA), the most common immunosuppressive drug used in transplantation, is a *de novo* purine nucleotide synthesis inhibitor that exerts a cytostatic effect on both T and B lymphocytes [6,7]. Originally isolated as a fermentation product of *Penicillium stoloniferum*, MPA is a broad-acting molecule with antifungal, antibacterial, and antiviral properties, in addition to its immunosuppressive activity [8,9]. In therapeutics, orally administered MPA is formulated as either a prodrug (mycophenolate mofetil, an MPA morpholinoethylester) or mycophenolate sodium, a salt. In the liver, MPA is metabolized by several UDP-glucuronosyltransferases into its main and inactive metabolite, MPA-7-O-glucuronide (MPAG) [10,11]. Liver generated MPAG (around 10%) is effluxed in the bile [12] and then re-activated into active MPA by the gut microbiome bacterial  $\beta$ -glucuronidases that contribute to MPA enterohepatic recirculation [13,14]. The release of active MPA when in contact with gut epithelial cells is thought to initiate gastro-intestinal adverse effect pathways [15–18]. The main observed symptoms are nausea, vomiting, diarrhoea, and bleeding ulcerations [19–21]. Histologically, gastro-intestinal lesions are characterised by crypt distortion and cell apoptosis, as well as mucosal architectural disorganisation, associated with the inflammation of the *lamina propria* [22,23]. The severity of the gut lesions can justify dose reduction or drug withdrawal, which may in turn increase the risk of graft rejection [15,24,25].

Preclinical studies, MPA was shown to alter tight junction protein homeostasis and impair intestinal permeability [26,27]. Impaired intestinal permeability is known to favour the translocation of luminal compounds such as bacterial lipopolysaccharides (LPS), and gut microbiota metabolites into the systemic compartment which promotes systemic low grade and chronic inflammation, endothelial activation, and ultimately cardiovascular complications [28,29]. Intestinal epithelial barrier dysfunction including impaired permeability has been described in inflammatory bowel diseases, alcoholic liver diseases, severe acute pancreatitis, type 1 and 2 diabetes, prolonged stress as well as arterial hypertension [30–36]. Of note, diabetes and arterial hypertension are well-known post-transplant complications [37–41].

In the present study, we hypothesize that MPA-treated transplant patient develops intestinal permeability. To assess intestinal permeability, we measured the blood concentration of a recognized biomarker of intestinal barrier integrity, the macromolecule LPS (around 5 000 g/mol) [42–46]. In addition, we also determined the circulating concentration of small-size bacterial metabolites, the short-chain fatty acids (SCFA, between 60 and 87 g/mol) acetate, propionate, and butyrate, as a potential marker of slightly impaired permeability. Thus, by combining both LPS and SCFA measurements in blood, we aimed to categorize intestinal permeability stages in MPA-treated patients.

## **Material and methods**

### **Patients and healthy volunteers**

The patients clinical data and plasma samples used in this study were collected as part of a multicentre pharmacokinetics study of immunosuppressive drugs in adult heart transplant patients (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00812786>) conducted in France according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, approved by the regional ethics committee and authorized by the French Drug Agency (EudraCT number n°2006-006832-23).

Plasma samples from the 45-heart transplant patients enrolled in the study are stored at the Biological Resource Centre of the Limoges University Hospital (CRBioLim, authorized by the French Ministry of Research under the reference AC-2016-2758; <http://www.crbiochim.fr>), 20 plasma samples were collected at one-year post-transplantation from patients on MPA. For comparison purposes, plasma samples were also collected from an ad hoc and comparable (in terms of age, body mass index) cohort of 20 healthy volunteers who had given their informed consent and whose samples are also stored at CRBioLim.

### **Systemic bacterial endotoxins and metabolites measurement**

#### *Plasma LPS quantitation*

The LPS enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cusabio, Houston, USA) was used to quantify LPS in the 40 plasma samples from healthy volunteers and transplant patients according to the manufacturer's instructions. A standard solution of LPS was used to quantify the amount of LPS in each plasma (concentrations of 0 to 400 pg/mL with a lower detection limit of 6.25 pg/mL). LPS concentration was measured in 100 µL of each plasma diluted at 1/4 in the provided sample diluent. The optical density of each well was determined using a microplate reader (EnSpire® Multimode Reader, PerkinElmer, USA).

### *Plasma SCFA quantitation*

Plasma samples were diluted 1/3 with cold isopropanol (v/v), vortexed for 5 min and centrifuged at 16,000g for 15 min at 4°C. Calibration standards (acetate from 5 to 1,000 µM, propionate from 0.25 to 50 µM and butyrate from 0.1 to 20 µM, from Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) were prepared in cold methanol. The SCFA derivatization step was based on a previously published method [47]. Briefly, 50 µL of each extracted plasma were mixed with 20 µL of 200 mM 3-nitrophenylhydrazine hydrochloride (diluted in a 50% aqueous acetonitrile solution), 20 µL of 120 mM N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (diluted in a 6% pyridine solution prepared with 96% ethanol), and 50 µL of pooled deuterated internal standard solution (D4-acetate 2.5 mM, D2-propionate 0,0125 mM, D7-butyrate 0.01 mM diluted in ultrapure water). The reaction of derivatization was performed at 40°C for 30 min in the dark and the samples were then analysed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Chromatographic separation was achieved using our previously published method [48]. Liquid chromatography separation was performed on an XSelect HSS T3 column (100 Å, 2.5 µm, 2.1 mm x 100 mm, Waters, Wilmslow, UK) at a flow rate of 0.2 mL/min at 60°C. The mobile phase was a gradient of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in methanol (solvent B) programmed as follows: 0-0.5 min, 30% of B; 0.5-5 min, 40% of B; 5-5.5 min, 95% of B; 5.5-7 min, 95% of B; 7-7.25 min, 30% of B. The multiple reaction monitoring parameters for all analytes and their internal standards were set as previously published [48]. The concentration of each SCFA was determined by calculating its corresponding peak area ratio to that of its deuterated internal standard and reporting it on the calibration curve obtained by linear regression with 1/x weighting to the calibration curve. The summed concentrations of the three SCFA (acetate, propionate and butyrate) were calculated for each sample.

### **Glomerular filtration rate measurement**

Serum creatine concentration was retrieved from medical records for transplant patients and measured on purpose for healthy volunteers, using the Roche Creatinine Plus enzymatic assay on a Cobas system. The glomerular filtration rate was estimated (eGFR) from serum creatinine concentration using the Chronic Kidney Disease Epidemiology collaboration (CKD-EPI) equation [49].

## **Mycophenolic acid exposure**

MPA plasma concentrations were measured using an LC-MS/MS method [50]. The area under the curve ( $AUC_{0-12h}$ , in mg.h/L) was calculated using the linear trapezoidal rule applied to MPA concentrations at pre-dose and 0.33, 0.66, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 and 12 hours to assess plasma MPA exposure.

## **Statistical analysis**

Differences in age, weight, height, body mass index (BMI), LPS and SCFA concentrations between healthy volunteers and transplant patients were statistically analysed using GraphPad Prism (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Data were reported as means  $\pm$  standard errors of the mean (SEM). Statistical comparisons between healthy volunteers and transplant patients were performed using the Student test with Welch correction for inequality of variances.

Healthy volunteers and transplant patients were clustered based on their plasma LPS and summed SCFA concentrations. Hierarchical agglomerative clustering on the principal components (HCPC) with Euclidian distance and the Ward method were applied after normalized principal component analysis (PCA). These analyses were performed with the FactoMineR (2.6) R package, using the PCA and HCPC functions. For each variable, the cluster means were compared using analysis of variance (ANOVA) with Welch approximation because of inequality of variances (`oneway.test` in stats 4.1.0 package) with the F statistic, the degree of freedom (df) and the p-value (p). Then a Dunnett's T3 test (`dunnettT3Test` function in the PMCMRplus 1.9.6 package) with unequal variances was used to compare each cluster with the first cluster as a reference with the mean, the statistic of the test (t) and the p-value (p).

## **Results**

### **MPA-treated transplant patient and healthy volunteers' characteristics**

There was no difference in the participants' age ( $53 \pm 3$  for transplant patients vs  $45 \pm 3$  years for healthy volunteers,  $p=0.09$ ), and the two groups were comparable for body weight ( $79 \pm 3$  kg for transplant patients vs  $74 \pm 3$  kg for healthy volunteers,  $p=0.21$ ), height ( $175 \pm 1$  cm for transplant patients vs  $175 \pm 2$  cm for healthy volunteers,  $p=0.93$ ) as well as body mass index ( $26 \pm 1$  kg/m<sup>2</sup> for transplant patients vs  $24 \pm 1$  kg/m<sup>2</sup> for healthy volunteers,  $p=0.76$ ) (**Table 1**).

**Table 1 - Characteristics of the study population**

	MPA-treated transplant patients (n=20)	Healthy volunteers (n=20)	p value
Age (years)	53 ± 3	45 ± 3	0.09
Sex ratio (F/M)	2/18	6/14	NA
Weight (kg)	79 ± 3	74 ± 3	0.21
Height (cm)	175 ± 1	175 ± 2	0.93
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 1	24 ± 1	0.13

F, female; M, male; BMI, body mass index; NA, non applicable

### Systemic bacterial LPS and SCFA levels

A higher level of plasma LPS was observed in MPA-treated transplant patients than in healthy volunteers (221.0 ± 38.5 pg/mL for transplant patients vs 77.2 ± 14.2 pg/mL for healthy volunteers, p=0.002). Moreover, the summed SCFA concentrations were significantly higher in transplant patients (116.2 ± 11.7 µM vs 46.0 ± 5.7 µM, respectively, p<0.0001) (**Table 2**).

**Table 2 – Plasma LPS and summed SCFA quantitation**

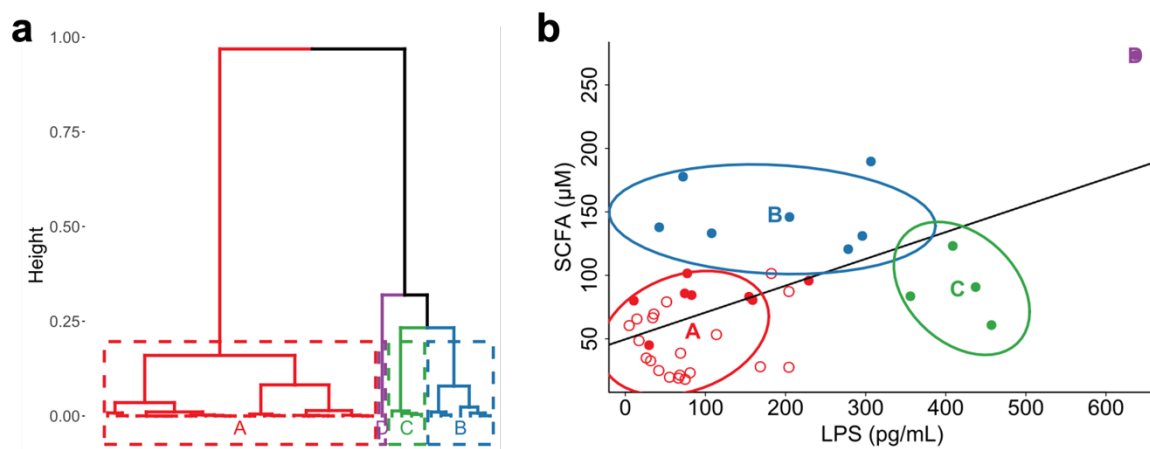
	MPA-treated transplant patients (n=20)	Healthy volunteers (n=20)	p value
LPS (pg/mL)	221.0 ± 38.5	77.2 ± 14.2	0.002
Summed SCFA (µM)	116.2 ± 11.7	46.0 ± 5.7	<0.0001

LPS, lipopolysaccharides; SCFA, short-chain fatty acids

### Clustering of the study population based on LPS and SCFA plasma concentrations

Hierarchical clustering analysis applied to the study population identified four groups, represented in **Figure 1a**. There was a positive correlation between plasma LPS and summed SCFA concentrations (Pearson correlation coefficient, r=0.58) (**Figure 1b**). Plasma LPS and

summed SCFA concentrations in each cluster are displayed in **Table 3**. Cluster A is constituted of 20 healthy volunteers and 8 transplant patients. It is characterized by the lowest concentrations of plasma LPS ( $84.3 \pm 12.5$  pg/mL) and of summed SCFA ( $56.3 \pm 5.4$   $\mu$ M). Cluster B is comprised of 7 transplant patients whose plasma LPS concentrations were higher than in cluster A ( $186.8 \pm 42.3$  pg/mL,  $p=0.14$ ) and with high levels of summed SCFA ( $148.0 \pm 9.7$   $\mu$ M,  $p=0.00001$ ). Cluster C, which includes 4 transplant patients, was characterized by elevated concentrations of LPS ( $414.7 \pm 22.0$  pg/mL,  $p=0.00001$ ) and slightly elevated levels of summed SCFA concentration than cluster A ( $89.6 \pm 12.9$   $\mu$ M,  $p=0.18$ ). Cluster D is made up of only 1 transplant patient who presented the highest concentrations of plasma LPS (636.6 pg/mL) and summed SCFA (273.4  $\mu$ M) concentrations.



**Figure 1 – Hierarchical clustering of based on LPS and SCFA quantitation.**

Dendrogram showing clusters from principal component analysis. Cluster A (red) with 20 healthy volunteers and 8 transplant patients, cluster B (blue) with 7 transplant patients, cluster C (green) composed of 4 transplant patients and cluster D (purple) included 1 transplant patient (a). Selected cluster represented in the LPS (pg/mL) and total SCFA ( $\mu$ M) plan, cluster letter is on its centroid and correlation line is in grey, dark circle represent transplant patients and white circle healthy volunteers (b).

*LPS, lipopolysaccharides; SCFA, short-chain fatty acids*

**Table 3 – Plasma LPS and summed SCFA quantitation according to clusters**

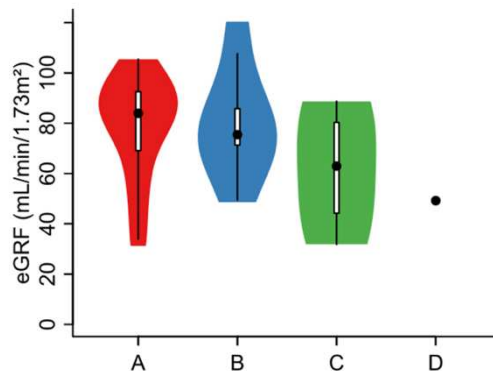
	Cluster A (n=28)	Cluster B (n=7)	Cluster C (n=4)	Cluster D (n=1)
<b>LPS (pg/mL)</b>	$84.3 \pm 12.5$	$186.8 \pm 42.3$ ( $p=0.14^*$ )	$414.7 \pm 22.0$ ( $p=0.00001^*$ )	636.6
<b>Summed SCFA (<math>\mu</math>M)</b>	$56.3 \pm 5.4$	$148.0 \pm 9.7$ ( $p=0.00001^*$ )	$89.6 \pm 12.9$ ( $p=0.18^*$ )	273.4

*LPS, lipopolysaccharides; SCFA, short-chain fatty acids; \* compared with cluster A*



## Renal function

The values of eGFR were not statistically significant in cluster B ( $79.8 \pm 8.5$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>, p=0.99), C ( $61.6 \pm 13.1$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>, p=0.59) and D ( $49.2$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>) as compared with cluster A ( $78.0 \pm 4.0$  mL/min/1.73m<sup>2</sup>) (**Figure 2**).



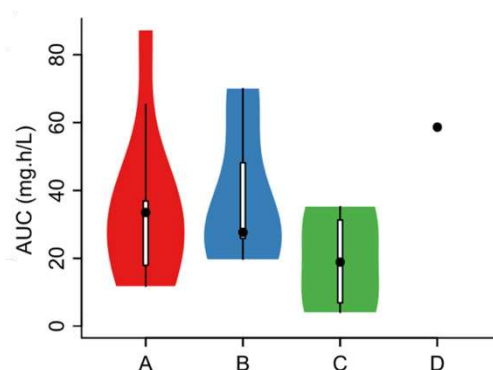
**Figure 2 – eGFR distribution by clusters**

Distribution of eGFR by clusters. Black points are the median and white rectangles are the interquartile distance. Colour surfaces are smooth representation of data distributions. Statistical analyses were performed with ANOVA with Welch approximation because of inequality of variances.

*eGFR, estimated glomerular filtration rate*

## MPA exposure in transplant patients

For transplanted patients spread out between clusters A, B, C and D, the AUC<sub>0-12h</sub> of MPA was calculated and is represented in **Figure 3**. These values of AUC<sub>0-12h</sub> were similar between clusters: cluster A ( $34.1 \pm 8.5$  mg.h/L), cluster B ( $37.9 \pm 7.8$  mg.h/L, p=0.98, compared to cluster A), cluster C ( $19.3 \pm 7.8$  mg.h/L, p=0.52, compared to cluster A) and cluster D ( $58.7$  mg.h/L, compared to cluster A).



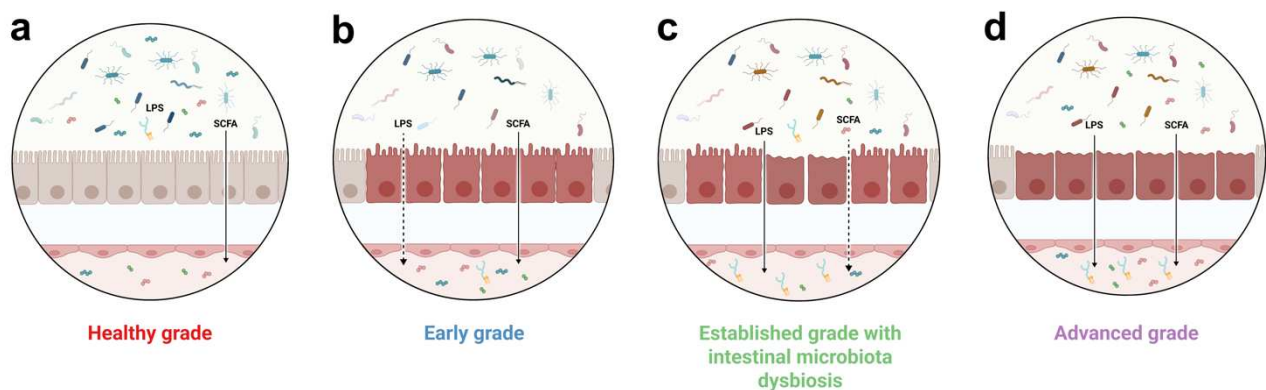
**Figure 3 – AUC distribution by clusters**

Distribution of AUC<sub>0-12h</sub> of mycophenolic acid from transplanted patients by clusters. Black points are the median and white rectangles are the interquartile distance. Colour surfaces are smooth representation of data distributions. Statistical analyses were performed with ANOVA with Welch approximation because of inequality of variances.

*AUC, area under the curve*

## Discussion

In this study, we explore the systemic translocation of bacterial products (*i.e.*, plasma LPS) and metabolites (*i.e.*, plasma SCFA) in a cohort of one-year post-transplantation MPA-treated patients and in an *ad hoc* cohort of healthy volunteers. We report for the first time the existence of increased intestinal permeability in MPA-treated transplant patients as inferred from plasma LPS and summed SCFA concentrations three and two times higher than in healthy volunteers, respectively. Through hierarchical clustering based on data from plasma LPS and summed SCFA concentrations, we were able to separate all the subjects into four groups featuring graded plasma LPS and SCFA concentrations (**Figure 4**).



**Figure 4 – Distinct grades of intestinal permeability according to plasma LPS and total SCFA**

(a) Healthy grade of intestinal permeability with intestinal homeostasis and permeation of small-size bacterial metabolites. (b) Early grade of intestinal permeability with increase permeation of small-size bacterial metabolites (such as SCFA). (c) Established grade of intestinal permeability with increase of endotoxins. (d) Advanced grade of intestinal permeability with increase permeation of all molecules.

IECs, intestinal epithelial cells; LPS, lipopolysaccharides; SCFA, short-chain fatty acids

### Intestinal permeability and endotoxemia under MPA therapy

In a context of precision medicine, detecting intestinal permeability at an early stage based on plasma LPS and summed SCFA concentrations would be useful. Detecting at early stage the intestinal permeability may alleviate chronic low-grade inflammation induced by leaky gut syndrome. The translocation of bacterial metabolites of antigen into systemic circulation can induce an immune response and promote a pro-inflammatory state [51]. Early intervention in the process of intestinal permeability could trigger inflammation resolution pathways by inducing pro-resolving mediators and thus limit the onset of co-morbidities [52]. Herein, we combined the measurement of systemic LPS concentration, already established as a biomarker of intestinal permeability [42–46], with the quantitation of small-size bacterial metabolites (as the sum of three SCFA) that may be more sensitive to the early stage of intestinal permeability. We assumed that the more the intestinal barrier is damaged, the more it

is permeable to large molecules. Thus, SCFA passage through the intestinal epithelium is accelerated when the barrier is slightly damaged while the systemic translocation of the endotoxin LPS requires a highly damaged barrier [53]. We thus consider that low levels of blood LPS and summed SCFA, as found in cluster A (20 healthy volunteers and 8 patients) sign an optimal epithelial barrier as expected in healthy conditions. A high level of summed SCFA with healthy-like condition plasma LPS, as observed in cluster B (7 MPA-treated transplant patients), is probably the result of a slightly permeable intestinal barrier. High level of LPS and low summed SCFA concentrations as seen in cluster C (4 MPA-treated transplant patients) are due to increased epithelial barrier permeability and the drop in concentration of plasma SCFA could be explained by an intestinal microbiota dysbiosis leading to decrease of SCFA-producing bacteria. Indeed, a decrease in butyrate-producing bacteria has been found in liver and kidney transplant patients [54]. High levels of both summed SCFA and the endotoxin LPS as measured in cluster D (1 MPA-transplant patients) translate into a severely damaged barrier. This patient does not appear to have a dysbiosis of the gut microbiota, as the levels of SCFA are high. These high levels of small molecules demonstrate damage to the intestinal barrier and therefore SCFAs are more likely to pass through in large quantities. Of note, patients in clusters A, B, C and D have similar eGFR; this result argues against a potential role of defective renal function in the increased blood SCFA level and endotoxemia. Despite the increased permeability of the epithelial barrier in transplant patients in cluster D, as compared to clusters B and C and despite the small size of MPA (320 g/mol), there is no increase in MPA concentration in blood. These results can be explained by dose adjustment, which adapts the dose to each patient, resulting in similar exposure despite sometimes different doses [10,55].

The increased permeability of intestinal epithelium in MPA-treated patients correlates with the finding of increase systemic LPS in MPA-treated mice [56]. Moreover, Qasim et al. described an increase of epithelial permeability as well as a redistribution of tight junction protein in intestinal epithelial cells cultured in the presence of MPA [26]. MPA was also found to induce cell apoptosis and intestinal barrier destruction with downregulation of tight junction proteins in a mouse model of MPA-induced enteropathy [27]. In addition, recent investigations demonstrated the presence of intestinal dysbiosis and the alteration of bacterial metabolite production in mice models of MPA-induced enteropathy [48,56,57]. Several studies suggested a possible association between altered microbiota composition and intestinal barrier dysfunction that may lead to increased intestinal permeability [58,59]. Actually, intestinal dysbiosis was observed in kidney transplant recipients; in these patients, the use of MPA correlated with lower diversity in the gut microbiota [54,60].

## **Major post-transplant co-morbidities are associated with intestinal permeability**

Co-morbidities affect transplant patients, the graft outcome and patient survival [61,62]. Indeed, the most important co-morbidity associated with solid organ transplantation is diabetes that affect 10 to 40% of transplant patients [63]. Solid organ transplantation is also associated with a large spectrum of cardiovascular diseases including hypertension, coronary artery disease and heart failure, which affect 50 to 80% adult recipients [64–66]. The causes of these co-morbidities are not well identified but are thought to be multifactorial, with a central role played by the drugs (glucocorticoids and calcineurin inhibitors) [63]. Other factors, such as intestinal permeability and increased blood LPS levels could also promote co-morbidity induced by chronic low-grade inflammation. Increased systemic LPS concentrations and/or activity was reported in patients with disrupted intestinal barrier permeability associated with type 2 diabetes mellitus or intestinal bowel diseases [67,68]. Increased intestinal permeability with endotoxemia was associated with systemic inflammation observed in a pre-clinical model of metabolic disorders [69]. Furthermore, the loss of gut barrier integrity and the alteration of tight junction proteins were associated with increased blood pressure in spontaneously hypertensive rats [36]. Moreover, the translocation of bacterial metabolites and products into the circulation is associated in human with cardiovascular diseases (atherosclerosis, hypertension and myocardial infarction) [70]. Interestingly, endotoxemia has been reported in kidney transplant patients and it correlated with systemic inflammation and endothelial activation [29]. Moreover, results showed that endotoxin levels may be associated with increased cardiovascular events in kidney transplant patients. Therefore, intestinal homeostasis should be sought for to prevent co-morbidities and to improve quality of life in transplant patients.

## **Conclusion**

We showed that MPA-treated transplant patients present increased intestinal barrier permeability, as compared to matched healthy volunteers from the general population. By combining summed SCFA and LPS measurements in plasma, we also demonstrated that patients are clustered into four groups regarding the severity of gut permeability: loss of barrier integrity is slight in 35% of transplant patients, intermediate in almost 20% and severe in 5%. A loss of gut epithelial integrity is associated with diabetes and cardiovascular diseases, the main co-morbidities in transplant patients. Increased intestinal permeability leads to translocation of bacterial products in the circulation and to the concomitant systemic low-grade inflammation that may promote co-morbidities in transplant patients. Thus, monitoring intestinal barrier integrity using a simple measurement of blood summed SCFA and LPS, as

we did, may help to quantify MPA-induced gut lesions and to better manage transplant patients in the future. Clinical studies are underway to validate these findings in other, larger cohorts.

## Acknowledgements

We acknowledge Dr Jean-Baptiste Woillard (Inserm, Univ. Limoges, CHU Limoges, P&T, U1248, F-87000, Limoges, France) for his valuable inputs and discussions during the preparation of this manuscript; Alexandre Garnier for providing us with patients' clinical data (Inserm, Univ. Limoges, CHU Limoges, P&T, U1248, F-87000, Limoges, France); Dr Pierre-Antoine Faye (biochemistry and molecular genetics service, CHU Limoges, F-87000, Limoges, France) for his availability for serum creatinine concentration measurement; the BISCEm platform (Univ. Limoges, Inserm US042, CNRS UAR 2015, CHU F-87000, Limoges, France) for mass spectrometry equipment.

## Disclosure

Authors report no conflicts of interest in this work.

## Abbreviations

AUC, area under the curve; BMI, body mass index; CKD-EPI, chronic kidney disease epidemiology collaboration; CRBioLim, Biological Resource Centre of the Limoges University Hospital; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; HCPC, hierarchical agglomerative clustering on the principal components; HRP, horseradish peroxidase; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; LPS, lipopolysaccharides; MPA, mycophenolic acid; MPAG, MPA-7-O-glucuronide; MRM, multiple reaction monitoring; PCA, principal component analysis; PIGREC, pharmacokinetics of immunosuppressive drugs in heart transplant patients; SCFA, short-chain fatty acids; SEM, standard error of the mean

## References

1. Grinyó JM. Why Is Organ Transplantation Clinically Important? *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(6):a014985. doi:10.1101/cshperspect.a014985
2. Black CK, Termanini KM, Aguirre O, Hawksworth JS, Sosin M. Solid organ transplantation in the 21st century. *Ann Transl Med.* 2018;6(20):409. doi:10.21037/atm.2018.09.68

3. Allison TL. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Nurs Clin North Am*. 2016;51(1):107-120. doi:10.1016/j.cnur.2015.10.008
4. Nevins TE, Nickerson PW, Dew MA. Understanding Medication Nonadherence after Kidney Transplant. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017;28(8):2290-2301. doi:10.1681/ASN.2017020216
5. Ruiz R, Kirk AD. Long-Term Toxicity of Immunosuppressive Therapy. *Transplant Liver*. Published online 2015:1354-1363. doi:10.1016/B978-1-4557-0268-8.00097-X
6. Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-Selective Cytostatic and Immunosuppressive Effects of Mycophenolic Acid in Vitro: Role of Deoxyguanosine Nucleotide Depletion. *Scand J Immunol*. 1991;33(2):161-173. doi:10.1111/j.1365-3083.1991.tb03746.x
7. Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J*. 1969;113(3):515-524. doi:10.1042/bj1130515
8. Strathie Page SJ, Tait CP. Mycophenolic acid in dermatology a century after its discovery: A century of mycophenolic acid. *Australas J Dermatol*. 2015;56(1):77-83. doi:10.1111/ajd.12259
9. Liu V, Mackool B. Mycophenolate in dermatology. *J Dermatol Treat*. 2003;14(4):203-211. doi:10.1080/09546630310016826
10. Colom H, Lloberas N, Andreu F, et al. Pharmacokinetic modeling of enterohepatic circulation of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Kidney Int*. 2014;85(6):1434-1443. doi:10.1038/ki.2013.517
11. Ferreira PCL, Thiesen FV, Pereira AG, Zimmer AR, Fröhlich PE. A short overview on mycophenolic acid pharmacology and pharmacokinetics. *Clin Transplant*. 2020;34(8):e13997. doi:https://doi.org/10.1111/ctr.13997
12. Westley IS, Brogan LR, Morris RG, Evans AM, Sallustio BC. Role of Mrp2 in the Hepatic Disposition of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolites: Effect of Cyclosporine. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(2):261-266. doi:10.1124/dmd.105.006122
13. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, et al. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol*. 1999;126(5):1075-1082. doi:10.1038/sj.bjp.0702399
14. Kodawara T, Masuda S, Yano Y, Matsubara K, Nakamura T, Masada M. Inhibitory effect of ciprofloxacin on  $\beta$ -glucuronidase-mediated deconjugation of mycophenolic acid glucuronide: ciprofloxacin-MPAG interaction via  $\beta$ -glucuronidase. *Biopharm Drug Dispos*. 2014;35(5):275-283. doi:10.1002/bdd.1894
15. Arns W. Noninfectious Gastrointestinal (GI) Complications of Mycophenolic Acid Therapy: A Consequence of Local GI Toxicity? *Transplant Proc*. 2007;39(1):88-93. doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.189

16. Davies NM, Grinyó J, Heading R, Maes B, Meier-Kriesche HU, Oellerich M. Gastrointestinal side effects of mycophenolic acid in renal transplant patients: a reappraisal. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2007;22(9):2440-2448. doi:10.1093/ndt/gfm308
17. Parfitt JR, Jayakumar S, Driman DK. Mycophenolate mofetil-related gastrointestinal mucosal injury: variable injury patterns, including graft-versus-host disease-like changes. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(9):1367-1372. doi:10.1097/pas.0b013e31816bf3fe
18. Sarkio S, Halme L, Kyllonen L, Salmela K. Severe gastrointestinal complications after 1,515 adult kidney transplantations. *Transpl Int*. 2004;17(9):505-510. doi:10.1111/j.1432-2277.2004.tb00479.x
19. Figurski MJ, Pawiński T, Goldberg LR, et al. Pharmacokinetic monitoring of mycophenolic acid in heart transplant patients: correlation the side-effects and rejections with pharmacokinetic parameters. *Ann Transplant*. 2012;17(1):68-78. doi:10.12659/aot.882638
20. Spasić A, Catić-Đorđević A, Veličković-Radovanović R, Stefanović N, Džodić P, Cvetković T. Adverse effects of mycophenolic acid in renal transplant recipients: gender differences. *Int J Clin Pharm*. 2019;41(3):776-784. doi:10.1007/s11096-019-00837-z
21. Calmet FH, Yarur AJ, Pukazhendhi G, Ahmad J, Bhamidimarri KR. Endoscopic and histological features of mycophenolate mofetil colitis in patients after solid organ transplantation. *Ann Gastroenterol*. 2015;28(3):366-373.
22. Papadimitriou JC, Cangro CB, Lustberg A, et al. Histologic Features of Mycophenolate Mofetil-Related Colitis: A Graft-Versus-Host Disease-Like Pattern. *Int J Surg Pathol*. 2003;11(4):295-302. doi:10.1177/106689690301100406
23. Izower MA, Rahman M, Molmenti EP, et al. Correlation of abnormal histology with endoscopic findings among mycophenolate mofetil treated patients. *World J Gastrointest Endosc*. 2017;9(8):405-410. doi:10.4253/wjge.v9.i8.405
24. Bunnapradist S, Lentine KL, Burroughs TE, et al. Mycophenolate Mofetil Dose Reductions and Discontinuations after Gastrointestinal Complications Are Associated with Renal Transplant Graft Failure. *Transplantation*. 2006;82(1):102-107. doi:10.1097/01.tp.0000225760.09969.1f
25. Pelletier RP, Akin B, Henry ML, et al. The impact of mycophenolate mofetil dosing patterns on clinical outcome after renal transplantation: Mycophenolate mofetil dosing and renal transplant outcome. *Clin Transplant*. 2003;17(3):200-205. doi:10.1034/j.1399-0012.2003.00026.x
26. Qasim M, Rahman H, Ahmed R, Oellerich M, Asif A. Mycophenolic acid mediated disruption of the intestinal epithelial tight junctions. *Exp Cell Res*. 2014;322. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.021
27. Deng Y, Zhang Z, Yang H, et al. Mycophenolic Acid Induces the Intestinal Epithelial Barrier Damage through Mitochondrial ROS. Zhang Z, ed. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1-18. doi:10.1155/2022/4195699

28. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(4):631-659. doi:10.1007/s00018-012-1070-x
29. Chan W, Bosch JA, Phillips AC, et al. The Associations of Endotoxemia With Systemic Inflammation, Endothelial Activation, and Cardiovascular Outcome in Kidney Transplantation. *J Ren Nutr.* 2018;28(1):13-27. doi:10.1053/j.jrn.2017.06.004
30. Fukui H. Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation? *Inflamm Intest Dis.* 2016;1(3):135-145. doi:10.1159/000447252
31. Lacerda JF, Lagos AC, Carolino E, Silva-Herdade AS, Silva M, Sousa Guerreiro C. Functional Food Components, Intestinal Permeability and Inflammatory Markers in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients.* 2021;13(2):642. doi:10.3390/nu13020642
32. Pasini E, Corsetti G, Assanelli D, et al. Effects of chronic exercise on gut microbiota and intestinal barrier in human with type 2 diabetes. *Minerva Med.* 2019;110(1):3-11. doi:10.23736/S0026-4806.18.05589-1
33. Karl JP, Margolis LM, Madslie EH, et al. Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2017;312(6):G559-G571. doi:10.1152/ajpgi.00066.2017
34. Keshavarzian A, Holmes EW, Patel M, Iber F, Fields JZ, Pethkar S. Leaky Gut in Alcoholic Cirrhosis: A Possible Mechanism for Alcohol-Induced Liver Damage. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 1999;94(1):200. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.00797.x
35. Liu H, Li W, Wang X, Li J, Yu W. Early gut mucosal dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas.* 2008;36(2):192-196. doi:10.1097/MPA.0b013e31815a399f
36. Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, et al. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circ Res.* 2017;120(2):312-323. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309006
37. Seeman T. Hypertension after renal transplantation. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2009;24(5):959-972. doi:10.1007/s00467-007-0627-7
38. Sorof JM, Sullivan KE, Tejani A, Portman RJ. Antihypertensive Medication and Renal Allograft Failure: A North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study Report. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(6):1324. doi:10.1681/ASN.V1061324
39. Midtvedt K, Neumayer HH. Management strategies for posttransplant hypertension. *Transplantation.* 2000;70(11 Suppl):SS64-69.
40. Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, et al. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation.* 2003;75(10 Suppl):SS3-24. doi:10.1097/01.TP.0000069952.49242.3E



41. Sharif A, Hecking M, de Vries APJ, et al. Proceedings From an International Consensus Meeting on Posttransplantation Diabetes Mellitus: Recommendations and Future Directions. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014;14(9):1992-2000. doi:10.1111/ajt.12850
42. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-834. doi:10.1080/17474124.2017.1343143
43. Hollander D, Kaunitz JD. The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? *Dig Dis Sci*. 2020;65(5):1277-1287. doi:10.1007/s10620-019-05777-2
44. Ghosh SS, Wang J, Yannie PJ, Ghosh S. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J Endocr Soc*. 2020;4(2):bvz039. doi:10.1210/jendso/bvz039
45. de Santana-Filho AP, Noletto GR, Gorin PAJ, de Souza LM, Iacomini M, Sasaki GL. GC-MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. *Carbohydr Polym*. 2012;87(4):2730-2734. doi:10.1016/j.carbpol.2011.11.073
46. Caroff M, Novikov A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identification. *OCL*. 2020;27:31. doi:10.1051/ocl/2020025
47. Han J, Lin K, Sequeira C, Borchers CH. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2015;854:86-94. doi:10.1016/j.aca.2014.11.015
48. Jardou M, Provost Q, Brossier C, Pinault É, Sauvage FL, Lawson R. Alteration of the gut microbiome in mycophenolate-induced enteropathy: impacts on the profile of short-chain fatty acids in a mouse model. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2021;22(1):66. doi:10.1186/s40360-021-00536-4
49. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-612.
50. Le Meur Y, Büchler M, Thierry A, et al. Individualized Mycophenolate Mofetil Dosing Based on Drug Exposure Significantly Improves Patient Outcomes After Renal Transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7(11):2496-2503. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01983.x
51. Vetrani C, Di Nisio A, Paschou SA, et al. From Gut Microbiota through Low-Grade Inflammation to Obesity: Key Players and Potential Targets. *Nutrients*. 2022;14(10):2103. doi:10.3390/nu14102103
52. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol*. 2016;7:160. doi:10.3389/fimmu.2016.00160
53. Vanuytsel T, Tack J, Farre R. The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. *Front Nutr*. 2021;8. doi:10.3389/fnut.2021.717925
54. Swarte JC, Douwes RM, Hu S, et al. Characteristics and Dysbiosis of the Gut Microbiome in Renal Transplant Recipients. *J Clin Med*. 2020;9(2):386. doi:10.3390/jcm9020386

55. Roberts M, Magnusson B, Burczynski F, Weiss M. Enterohepatic circulation: Physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41:751-790.
56. Flannigan KL, Taylor MR, Pereira SK, et al. An intact microbiota is required for the gastrointestinal toxicity of the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* 2018;37(9):1047-1059. doi:10.1016/j.healun.2018.05.002
57. Taylor MR, Flannigan KL, Rahim H, et al. Vancomycin relieves mycophenolate mofetil-induced gastrointestinal toxicity by eliminating gut bacterial  $\beta$ -glucuronidase activity. *Sci Adv.* 2019;5(8). doi:10.1126/sciadv.aax2358
58. Stan TL, Soylu-Kucharz R, Burleigh S, et al. Increased intestinal permeability and gut dysbiosis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Sci Rep.* 2020;10(1):18270. doi:10.1038/s41598-020-75229-9
59. Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(42). doi:10.1073/pnas.1415174111
60. Swarte JC, Li Y, Hu S, et al. Gut microbiome dysbiosis is associated with increased mortality after solid organ transplantation. *Sci Transl Med.* 2022;14(660):eabn7566. doi:10.1126/scitranslmed.abn7566
61. Wu C, Evans I, Joseph R, et al. Comorbid conditions in kidney transplantation: association with graft and patient survival. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2005;16(11):3437-3444. doi:10.1681/ASN.2005040439
62. Tovikkai C, Charman SC, Praseedom RK, Gimson AE, Meulen J van der. Time-varying impact of comorbidities on mortality after liver transplantation: a national cohort study using linked clinical and administrative data. *BMJ Open.* 2015;5(5):e006971. doi:10.1136/bmjopen-2014-006971
63. Chowdhury TA. Post-transplant diabetes mellitus. *Clin Med.* 2019;19(5):392-395. doi:10.7861/clinmed.2019-0195
64. Chauhan K, Khan A, Chowdhury S, Ross HM, Parra NS, Halegoua-DeMarzio D. A Comprehensive Review on the Risk of Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease after Liver Transplantation. *Livers.* 2022;2(2):85-96. doi:10.3390/livers2020006
65. Korogiannou M, Xagas E, Marinaki S, Sarafidis P, Boletis JN. Arterial Stiffness in Patients With Renal Transplantation; Associations With Co-morbid Conditions, Evolution, and Prognostic Importance for Cardiovascular and Renal Outcomes. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6. Accessed January 26, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2019.00067>
66. Weir MR, Burgess ED, Cooper JE, et al. Assessment and Management of Hypertension in Transplant Patients. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(6):1248. doi:10.1681/ASN.2014080834

67. Tulkens J, Vergauwen G, Van Deun J, et al. Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. *Gut*. 2020;69(1):191-193. doi:10.1136/gutjnl-2018-317726
68. Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, et al. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2014;388(1-2):203-210. doi:10.1007/s11010-013-1911-4
69. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-1481. doi:10.2337/db07-1403
70. Lewis CV, Taylor WR. Intestinal barrier dysfunction as a therapeutic target for cardiovascular disease. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2020;319(6):H1227-H1233. doi:10.1152/ajpheart.00612.2020

## **II.8. Travail expérimental 2 : Altérations du microbiote digestif dans l'entéropathie induite par l'acide mycophénolique : impact sur le profil des acides gras à chaîne courte dans un modèle murin**

Par la suite, afin d'étudier le microbiote digestif, nous avons développé, standardisé et validé un modèle murin d'entéropathie sévère induite par le MPA. Étant donné la complexité et les exigences logistiques liées à la collecte d'échantillons fécaux chez les patients transplantés et les potentiels biais d'interprétation du fait de la polymédication, nous avons opté pour le développement d'un modèle murin permettant d'étudier les altérations fonctionnelles du microbiote digestif pour lequel le recueil et l'étude des échantillons fécaux serait plus simple. Au regard des caractéristiques de la dysbiose chez l'homme et de l'altération de la barrière intestinale induite par l'immunosuppression, nous nous sommes concentrés notamment sur les SCFA. En effet, ces SCFA sont fortement impliqués dans la modulation du système immunitaire par leurs récepteurs présents sur une majorité de cellules de l'immunité. De plus, les SCFA contribuent à maintenir l'intégrité de la barrière intestinale en régulant la perméabilité et la motilité intestinale [120].

Les *données complémentaires* au travail expérimental 2 sont présentées à l'**Annexe 2**.

RESEARCH

Open Access

# Alteration of the gut microbiome in mycophenolate-induced enteropathy: impacts on the profile of short-chain fatty acids in a mouse model



Manon Jardou<sup>1</sup>, Quentin Provost<sup>1</sup>, Clarisse Brossier<sup>1</sup>, Émilie Pinault<sup>1</sup>, François-Ludovic Sauvage<sup>1</sup> and Roland Lawson<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Mycophenolic acid (MPA) is the most widely used immunosuppressive drug in transplantation and for autoimmune diseases. Unfortunately, more than 30% of patients experience a typical gastrointestinal adverse effect also referred to as mycophenolate-induced enteropathy. Due to its antibacterial, antifungal, and antiviral properties, MPA exposure is associated with intestinal dysbiosis characterized by a decrease in density and diversity of the microbiome regarding the main bacterial phyla (Firmicutes and Bacteroidetes). These bacterial phyla are known for their metabolic role in maintaining the homeostasis of the digestive tract, particularly through the production of short-chain fatty acids (SCFA) that could contribute to the pathophysiology of mycophenolate-induced enteropathy. Our study aimed at deciphering short-chain fatty acids (SCFA) profile alterations associated with gastrointestinal toxicity of MPA at the digestive and systemic levels in a mouse model.

**Methods:** Ten-week old C57BL/6 (SOPF) mice were randomly assigned in 2 groups of 9 subjects: control, and mycophenolate mofetil (MMF, 900 mg/kg/day). All mice were daily treated by oral gavage for 7 days. Individual faecal pellets were collected at days 0, 4 and 8 as well as plasma at day 8 for SCFA profiling. Additionally, after the sacrifice on day 8, the caecum was weighted, and colon length was measured. The proximal colon was cut for histological analysis.

**Results:** MMF treatment induced around 10% weight loss at the end of the protocol associated with a significant decrease in caecum weight and a slight reduction in colon length. Histological analysis showed significant architectural changes in colon epithelium. Moreover, we observed an overall decrease in SCFA concentrations in faecal samples, especially regarding acetate (at day 8, control  $1040.6 \pm 278.161 \mu\text{M}$  versus MMF  $384.7 \pm 80.5 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ) and propionate (at day 8, control  $185.94 \pm 51.96 \mu\text{M}$  versus MMF  $44.07 \pm 14.66 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ), and in plasma samples for butyrate (at day 8, control  $0.91 \pm 0.1 \mu\text{M}$  versus MMF  $0.46 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ).

**Conclusions:** These results are consistent with functional impairment of the gut microbiome linked with digestive or systemic defects during MMF treatment.

\* Correspondence: [roland.lawson@unilim.fr](mailto:roland.lawson@unilim.fr)

<sup>1</sup>Univ. Limoges, Inserm U1248, IPPRIT, F-87000 Limoges, France

<sup>2</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

**Keywords:** Mycophenolate-induced enteropathy, Gut microbiome, Short-chain fatty acids, Acetate, Propionate, Butyrate

## Background

Mycophenolic acid (MPA) is one of the most widely used immunosuppressants in transplantation and for the treatment of some autoimmune diseases [1–3]. MPA, used as a prodrug (mycophenolate mofetil or MMF) or a salt (mycophenolate sodium), is a potent, selective, non-competitive and reversible inhibitor of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2). IMPDH2 plays a key role in the de novo purine nucleotide synthesis, on which lymphocytes rely for DNA biosynthesis. Therefore, MPA exerts preferentially a cytostatic effect in T and B lymphocytes, which do not possess the recovery pathway for DNA biosynthesis through hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) [4]. After oral absorption, MPA enters the systemic circulation where it directly acts on circulating lymphocytes. MPA can also reach lymphoid tissues (e.g., bone marrow, thymus, lymph nodes and spleen) for modulating in situ lymphocyte differentiation and activation [5, 6].

MPA treatment is unfortunately associated with adverse effects, among which gastrointestinal disorders are of major concern [7]. More than 30% of patients experience gastrointestinal adverse effects, ranging from nausea, vomiting, abdominal pain or diarrhoea, to erosions of the gastrointestinal tract with life-threatening bleeding ulcerations [8, 9]. Histologically, the lesions are characterized by architectural disorganization of the digestive epithelium mainly in the colon. Oedema and/or inflammation of the *lamina propria* are also observed, mimicking the inflammatory lesions of graft-versus-host disease in bone marrow transplantation [7, 10–12].

Recent investigations have pointed to the alteration of the gut microbiome, also referred to as intestinal dysbiosis, by immunosuppressive agents. Moreover, intestinal dysbiosis is responsible for abnormal gut microbiome  $\beta$ -glucuronidase activity and increased gastrointestinal exposure to MPA in mycophenolate-induced enteropathy [13–16]. MPA was first isolated as a fermentation product of *Penicillium stoloniferum* and was initially known for its antibacterial, antifungal, and antiviral properties [4]. Therefore, gastrointestinal tract exposure to high concentrations of MPA is expected to be associated with intestinal dysbiosis characterized by a decrease in density and diversity of the gut microbiome regarding the main bacterial phyla (e.g., Firmicutes and Bacteroidetes) which has been recently validated with a mouse model [15, 16]. These bacterial phyla are known for their metabolic role in maintaining the homeostasis of the digestive tract, particularly through the production of short-chain fatty

acids (SCFA) from the fermentation of indigestible carbohydrates [17–20]. The three main SCFA (acetate, propionate and butyrate) can passively penetrate and pass through intestinal cells. SCFA can also be actively incorporated through sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 (SMCT1) or monocarboxylate transporter 1 (MCT1) located on the apical side of intestinal epithelial cells and transported into the bloodstream through monocarboxylate transporter 4 and 5 (MCT4 and MCT5) found on the basolateral side [21–23]. SCFA are pharmacologically active and can selectively regulate three different G-protein coupled receptors (GPCR) on intestinal cells, namely, GPR41 (free fatty acid receptor 3 or FFAR3), GPR43 (free fatty acid receptor 2 or FFAR2) and GPR109A (hydroxycarboxylic acid receptor 2 or HCAR2) [24–26]. These receptors are also expressed on various other cell types in organs and tissues such as the liver, muscles, neurons and immune cells (T and B cells, macrophages) [27, 28]. SCFA function as “co-hormones” as they are produced by the gut microbiome, which is assimilated to a metabolic organ. Intracellular SCFA can exhibit a strong histone deacetylase (HDAC) inhibitory effect, with butyrate being the most potent inhibitor [29–32]. Histone hyperacetylation is associated with increased accessibility of promoter regions and genes modulation [33]. For example, butyrate through its HDAC inhibitory activity, can imprint an antimicrobial program in macrophages and thus, eliminate invasive pathogens and regulate the inflammatory response [34]. Butyrate can also be a source of energy for the colonocytes and can improve epithelial barrier functions through up-regulation of tight junctions proteins such as Claudin-1 and ZO-1 [35, 36]. SCFA may also have beneficial effects on gut homeostasis by enhancing mucosal barrier integrity through Mucin-2 expression [37]. Hence, the functional alterations of the SCFA profile can be involved in the pathophysiology of the mycophenolate-induced enteropathy. Our study aimed at analyzing the alterations of the SCFA profile at the local and systemic levels and their associations with the gastrointestinal toxicity of mycophenolic acid in a mouse model.

## Methods

### Experimental animals

In this study, our experimental model is inspired by the pioneering work published by Flannigan et al., 2018 [16] and Taylor et al., 2019 [15], which demonstrated an impairment of the gut microbial community associated with colon tissue inflammation under MPA treatment.

For this purpose, female C57BL/6J adult (10 weeks old) Specific and Opportunistic Pathogen Free mice purchased from Janvier Labs (Saint-Berthevin, France) were used for in vivo experiments and were housed in a pathogen-free animal facility, with 12 h/12 h of light/dark and unrestricted access to food and water. The Regional Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA-033, Région Limousin) and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation, under Project Authorization for the use of Animals for Scientific Purposes 23,785-2,020,012,416,174,896 v3, approved animal care and experimental procedures. These experimental procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the European Communities Council Directive (EU/63/2010) and reported according to the ARRIVE guidelines [38]. Eighteen mice were randomly assigned into two groups: control ( $n = 9$ ) and MMF ( $n = 9$ ) and treated for 7 days. Mice were daily monitored for body weight. MMF treatment (900 mg/kg/day of a clinical formulation of MMF (Celcept®) dissolved in saline solution) or saline solution (control group) were given by oral gavage with a 20 Gauge dosing cannula. For the sacrifice, the mice were anaesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (100 mg/kg, CEVA Santé Animale, France).

#### Sample collection and storage

##### Faeces

Individual faecal pellets were collected using metabolic cages at day 0, day 4 and day 8 and were placed in a sterile collection tube and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for SCFA analysis.

##### Plasmas

Peripheral blood was obtained using a 22 Gauge heparinised syringe from anaesthetised mice on day 8 by intracardiac puncture and plasma was prepared by centrifugation at  $10,000g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for SCFA analysis.

##### Caecum/colon block

The block caecum/colon was harvested after sacrifice. The caecum was weighted and colon length measured. The proximal colon (around 1 cm) was cut and placed in a 4% formaldehyde solution for histological analysis.

#### SCFA quantification

##### Samples preparations

To quantify the SCFA in faecal samples, 25  $\mu\text{L}$  of 50% aqueous acetonitrile solution was added to 1 mg of faeces, vortex mixed for 10 min and then placed for 10 min in an ultrasonic bath. The samples were centrifuged at  $10,000g$  at  $10^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The supernatants were collected. This procedure was repeated twice for each faecal

sample and the supernatants were pooled. For plasma SCFA analysis, the samples were directly diluted 1:5 with a saline solution. Calibration standards (acetate from 10 to  $5000\mu\text{M}$ , propionate from 1 to  $500\mu\text{M}$ , butyrate from 0.4 to  $200\mu\text{M}$ ) were prepared either in 50% aqueous acetonitrile for faecal samples or in saline solution for plasma samples.

The SCFA derivatization step was based on a previously published method [39]. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of each sample (pooled supernatants for faeces or diluted plasma) were mixed with 20  $\mu\text{L}$  of 200 mM 3-NPH, 20  $\mu\text{L}$  of 120 mM EDC-6% pyridine, both solubilised in 50% aqueous acetonitrile solution, and 20  $\mu\text{L}$  of pooled internal standard solution (D4-acetic acid 10 mM, D2-propionic acid 0.4 mM, D7-butyric acid 0.25 mM diluted in ultrapure water). The reaction was performed at  $40^{\circ}\text{C}$  for 30 min in the dark and the samples were then diluted 1:20 (v/v) with 10% aqueous acetonitrile, and 1  $\mu\text{L}$  or 5  $\mu\text{L}$  thereof (for faeces or plasma derivation mixture respectively) were analysed by LC-MS/MS.

##### LC-MS/MS analysis

Briefly, chromatographic separation was performed using a Shimadzu Nexera 2 LC system (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) equipped with a thermostated column compartment and a thermostated microwell plate autosampler with a six-port micro-switching valve. LC separation was performed on an Accucore™ RP-MS column (100  $\times$  2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$  solid core, Thermo Scientific) at a flow rate of 0.2 mL/min at  $60^{\circ}\text{C}$ . The mobile phase was a gradient of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in methanol (solvent B) programmed as follows: 0-0.5 min, 30% B; 0.5-8 min, 30 to 50% B; 8-9 min, 50 to 95% B; 9-11 min, 95% B; 11-11.5 min, 95 to 30% B; 11.5-15 min, 30% B. Detection was carried out with a LCMS8060 mass spectrometer (Shimadzu) in the positive ionization mode. Of the four optimized MRM transitions per analyte, the most intense and specific Q1/Q3 pair was selected for quantification: 194 > 137 for acetic acid, 197 > 137 for D4-acetate, 208 > 137 for propionic acid, 210 > 137 for D2-propionate, 222 > 137 for butyric acid and 229 > 137 for D7-butyrate. The MRM parameters for all analytes and their internal standards are listed in Table S1. The concentration of each SCFA was determined by calculating its corresponding peak area ratio to that of the IS using a linear regression with  $1/x$  weighting to the calibration curve.

##### Histological analysis

Fixed proximal colon samples were paraffin-embedded, sectioned at 4  $\mu\text{m}$  and stained with haematoxylin, eosin and saffron (HES). The slides were scanned using an automatic slide scanner (Nanozoomer, HAMAMATSU

PHOTONICS K.K., Systems Division, Japan) and images obtained were analysed using NDP.view2 (version 2.8, HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Systems Division, Japan) and ImageJ (version 1.53) [40] software. The lesions were quantified based on variations of tissue interface, which are obtained by the difference between the whole section and the luminal section.

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) and data are reported as arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons between experimental groups were performed using unpaired t-test or two-way ANOVA. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. When applied, the post-hoc test of Bonferroni was conducted if F value in ANOVA achieved statistical significance ( $p < 0.05$ ) with no significant variance inhomogeneity. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score plots were made using the R Tidyverse package [41].

## Results

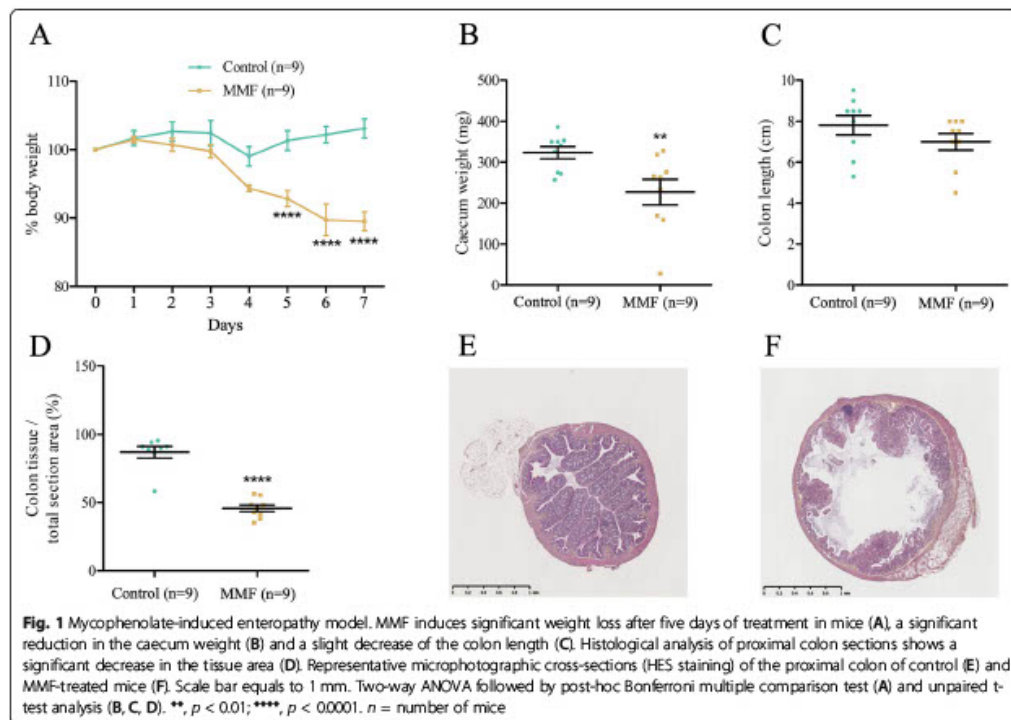
### MPA-induced enteropathy mouse model

MMF treatment is associated with a significant weight loss starting at day 5 to reach approximately 10% at day 7 (control  $103.1 \pm 1.41\%$  versus MMF  $89.88 \pm 1.28\%$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1A). This body weight loss is accompanied by a significant reduction in caecum weight (control  $323.3 \pm 14.87$  mg versus MMF  $226.8 \pm 31.51$  mg,  $p < 0.01$ ) (Fig. 1B) and a slight, non-significant decrease in colon length (control  $7.81 \pm 0.47$  cm versus MMF  $7.00 \pm 0.41$  cm,  $p > 0.05$ ) (Fig. 1C). Histological analysis revealed overall architectural disorganization and a significant decrease in the proximal colon tissue area (control  $86.94 \pm 4.21\%$  versus MMF  $45.68 \pm 2.42\%$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1D). Microphotographic observations showed an almost complete destruction of the intestinal crypts and villi in MMF-treated mice in comparison to controls (Fig. 1E and F). Altogether, these data corroborate the development of a validated model of gastrointestinal toxicity in mice.

### SCFA profile alterations

#### Modifications in the digestive production of SCFA

SCFA in faeces were quantified at days 0, 4 and 8 to investigate functional alterations of the gut microbiome





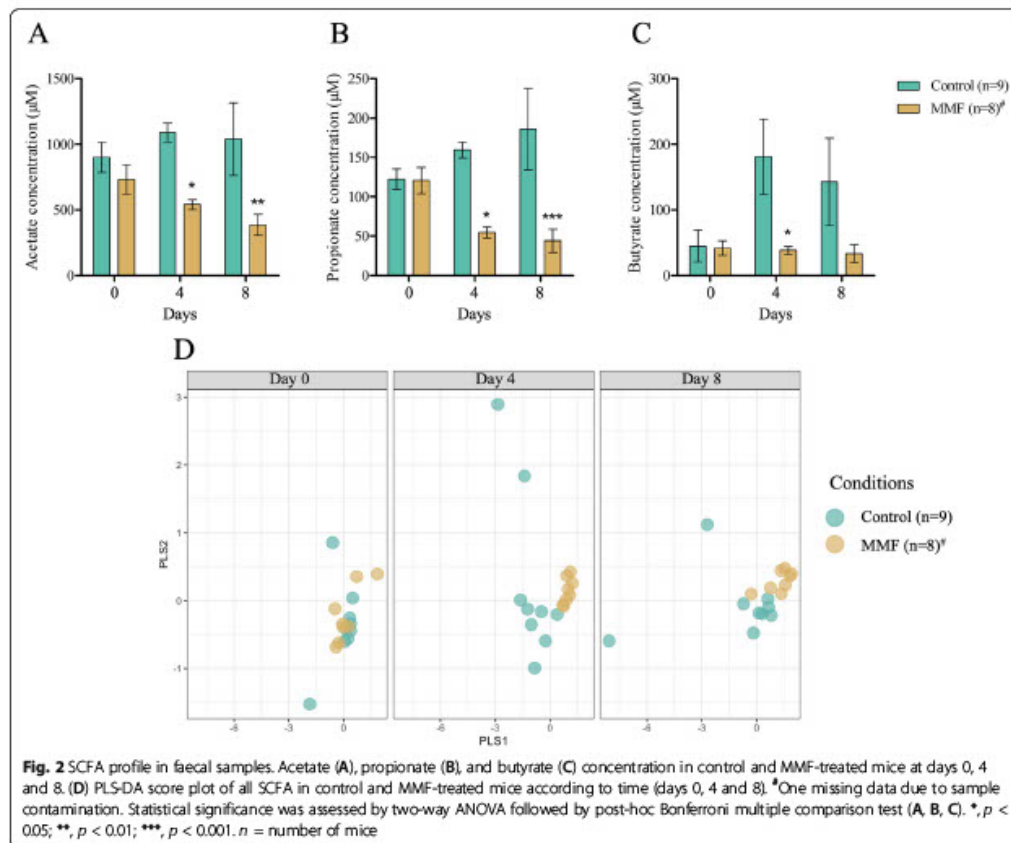
induced by MMF. We found a significant decrease of acetate at day 4 (control  $1090.5 \pm 71.88 \mu\text{M}$  versus MMF  $540.3 \pm 37.6 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ) and day 8 (control  $1040.6 \pm 278.161 \mu\text{M}$  versus MMF  $384.7 \pm 80.5 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ) in MMF-treated mice in comparison to controls (Fig. 2A). The results was similar for propionate concentrations at day 4 (control  $159.5 \pm 10.27 \mu\text{M}$  versus MMF  $54.34 \pm 6.84 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ) and day 8 (control  $185.94 \pm 51.96 \mu\text{M}$  versus MMF  $44.07 \pm 14.66 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2B). Overall, there was no time-dependent modification in butyrate concentrations for MMF-treated mice despite fluctuation in the control group, leading to a significant difference only at day 4 (control  $181.1 \pm 57.4 \mu\text{M}$  versus MMF  $38.55 \pm 6.08 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2C). The score plot of the PLS-DA model which includes concentrations of the three SCFA (acetate, propionate, butyrate) showed two groups at days 4 and 8 (Fig. 2D).

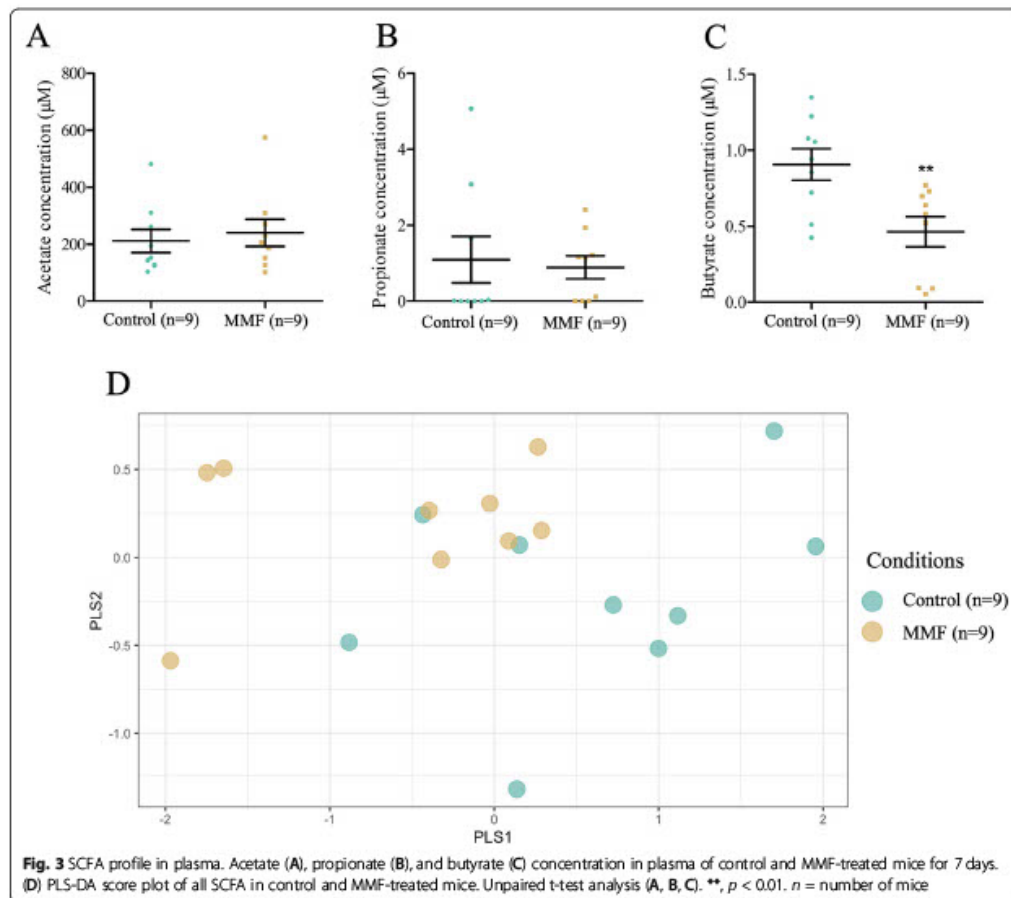
#### Modifications of SCFA plasma concentrations

SCFA in plasma were quantified from samples obtained at day 8 after sacrifice. There was no change in acetate (control  $211.5 \pm 40.76 \mu\text{M}$  versus MMF  $240.2 \pm 47.41 \mu\text{M}$ ,  $p > 0.05$ ) or propionate (control  $1.09 \pm 0.61 \mu\text{M}$  versus MMF  $0.89 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ,  $p > 0.05$ ) concentrations (Fig. 3A and B). In contrast, a significant decrease in butyrate concentrations was observed (control  $0.91 \pm 0.1 \mu\text{M}$  versus MMF  $0.46 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3C). Again, the score plot of the PLS-DA model with the three SCFA showed two groups (Fig. 3D).

#### Discussion

In the current study, we developed and validated a mouse model of mycophenolate-induced enteropathy that showed typical remodelling lesions of the colonic epithelium architecture. Detailed analyses of the concentration-time profile of the three main SCFA





revealed for the first time a functional alteration of the gut microbiome associated with MPA.

#### Severe enteropathy associated with MPA treatment

Our mice present an important decrease in body weight and exhibit typical and severe histological lesions, characterized by oedematous colonic mucosa with withering or marked crypt drop-out and villi destructions. These observations are consistent with the pattern of inflammatory injuries observed in treated patients with endoscopic evidence of ulcers and erosions [10–12]. Histologically, in these patients, the pattern of injury is typified by prominent crypt apoptosis with graft-versus-host-like-disease [8, 42, 43]. The caecum weight and colon length reduction could result from the direct impact of MPA on intestinal cells homeostasis [44].

#### Alterations of the gut microbiome in mycophenolate-induced enteropathy

Recent reports have highlighted intestinal dysbiosis associated with MPA therapy [15, 16]. Intestinal dysbiosis has been linked to the decrease of the main pro-resolving mediators involved in the control of inflammatory processes and tissue damage [45, 46]. Our investigations thereby focus on the SCFA concentration-time profile and demonstrate digestive and systemic alterations in mycophenolate-induced enteropathy in mice. Indeed, there is a drastic reduction in digestive SCFA production of acetate and propionate that could contribute to the pathophysiology of mycophenolate-induced enteropathy. Along with this, it has been shown that germ-free or large spectrum antibiotic-treated mice show reduced proliferative activity of intestinal epithelial cells, which is reversed by SCFA supplementation [47].

Moreover, acetate, propionate and butyrate promote the development of intestinal organoids in vitro [47, 48]. In addition, increased gut microbiota SCFA production had a protective effect on a mouse model of acute experimental colitis [49, 50]. SCFA also diminished the development of tumours and attenuated colonic inflammation in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer [51]. SCFA exert important roles in gut homeostasis and might be proposed as supportive therapy for patients treated with MPA.

Our data also demonstrate an important reduction of systemic plasma butyrate concentrations that might initiate pathological pathways in patients. Indeed, a close link between butyrate decrease and the onset of some cardiovascular or metabolic events was described [52]. For instance, de novo diabetes after solid organ transplantation is a complication that increases the risk of infections and graft failure in liver or kidney transplant patients [53, 54]. The immunosuppressive regimen also plays a critical role in the development of de novo diabetes, since tacrolimus and MMF strongly increase the incidence of new-onset diabetes after liver transplantation [55]. Butyrate supplementation promotes the mitigation of insulin resistance in animal models and protects against metabolic disorders [56, 57]. Regarding cardiovascular co-morbidities, arterial hypertension is frequently observed in kidney transplant patients [58]. Again, butyrate might exert a protective role since it suppressed angiotensin II-induced hypertension in a rat model [59].

Further investigations are needed to study the link between specific chronic diseases that require transplantation and the worsening of SCFA profile in post-transplantation periods. Moreover, the alterations of the gut microbiome induced by MPA could rationalize the progressive growth in the incidence of multidrug-resistance and extensively-drug-resistant strains in transplant patients [60, 61].

This will be helpful to decipher the specific impact of immunosuppressants. SCFA profile could be used as either as a predictive or a diagnostic biomarker for the follow-up of transplanted patients. SCFA supplementation might also be beneficial for treating mycophenolate-induced enteropathy.

## Conclusions

Our investigations reveal for the first time alterations of the SCFA time-profile in a mouse model of mycophenolate-induced enteropathy. This alteration could locally contribute to the inflammatory processes of mycophenolate-induced enteropathy. Moreover, decreased butyrate plasma concentrations might trigger pathological pathways leading to cardiovascular or metabolic comorbidities such as arterial hypertension or de novo diabetes in MPA-treated

patients. Further investigations are needed to establish the molecular mechanisms and their relevance in human pathology. If these hypotheses are confirmed, SCFA can be envisaged in supplementation to improve the patients' quality of life or as biomarkers of mycophenolate-induced enteropathy.

## Abbreviations

S/MCT: (Sodium-coupled) monocarboxylate transporter; 3-NPH: 3-nitrophenylhydrazine; EDC: N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide; FFAR: Free fatty acid receptor; GPCR: G-protein coupled receptors; HDAC: Histone deacetylase; HES: Haematoxylin, eosin and saffron; HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IMPDH2: Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2; MMF: Mycophenolic mofetil; MPA: Mycophenolic acid; PLS-DA: Partial least squares discriminant analysis; SCFA: Short-chain fatty acid

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40360-021-00536-4>.

### Additional file 1.

## Acknowledgements

We acknowledge Prof. Pierre Marquet and Dr. Jean-Baptiste Wollard (Univ. Limoges, Inserm U1248, IPRITT) for their valuable inputs and discussions during the preparation of this manuscript; the BISCem platform (Univ. Limoges, Inserm US042, CNRS UMS 2015, CHU Limoges) for providing animal facility and mass spectrometry equipment.

## Authors' contributions

M.J., E.P., and R.L. designed the study, were involved in planning, and supervised the work. M.J. and R.L. performed analysis, drafted the manuscript, and designed the Figs. Q, P and C. B. performed experiments supervised by M.J., E.P. and R.L. E.P. and F.-L.S. developed techniques of mass spectrometry. M.J. and R.L. wrote the paper with input from all authors, who have read and approved the final manuscript.

## Funding

M.J. is supported by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation and the University of Limoges.

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

The Regional Ethics Committee for Animal Experimentation (CEEA-083, Région Limousin) and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation, under Project Authorization for the use of Animals for Scientific Purposes 23785-2020012416174896 v3, approved animal care and experimental procedures. These experimental procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the European Communities Council Directive (EU/63/2010).

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

There are no competing interests to declare.

Received: 10 September 2021 Accepted: 20 October 2021  
Published online: 28 October 2021

## References

- Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing chronic rejection. *Transplant Proc.* 2002;34(7):2863–6.
- Srinivas TR, Kaplan B, Meier-Kriesche H-U. Mycophenolate mofetil in solid-organ transplantation. *Expert Opin Pharmacother.* 2005;4(12):2325–45.
- Zizzo G, De Santis M, Ferracioli GF. Mycophenolic acid in rheumatology: mechanisms of action and severe adverse events. *Rheumatismo.* 2010;62(2):91–100.
- Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology.* 2000;47(2–3):85–118.
- Fejzani H, Draz H, Abid S, Achour A, Bacha H, Boussema-Ayed I. Combination of tacrolimus and mycophenolate mofetil induces oxidative stress and genotoxicity in spleen and bone marrow of Wistar rats. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2016;810:48–55.
- Eugui EM, Mikovich A, Allison AC. Lymphocyte-selective Antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol.* 1991;33(2):175–83.
- Kitchin JES, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K, Shupack JL. Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol.* 1997;37(3):445–9.
- Al-Abisi AJ, Cooke CR, Wall BM, Sylvester P, Ismail MK, Mya M. Patterns of injury in mycophenolate Mofetil-related colitis. *Transplant Proc.* 2010;42(9):3591–3.
- Behrend M. Adverse gastrointestinal effects of mycophenolate Mofetil. *Drug Saf.* 2001;24(9):645–63.
- Seminio J, McGrath K, Arnold CA, Voltaggio L, Singhi AD. Medication-associated lesions of the GI tract. *Gastrointest Endosc.* 2014;79(1):140–50.
- Calmet FH, Yarus AJ, Pukazhendhi G, Ahmad J, Bhamidimarri KR. Endoscopic and histological features of mycophenolate mofetil colitis in patients after solid organ transplantation. *Ann Gastroenterol Q Publ Hel Soc Gastroenterol.* 2015;28(3):366.
- Selbst MK, Ahrens WA, Robert ME, Friedman A, Proctor DD, Jain D. Spectrum of histologic changes in colonic biopsies in patients treated with mycophenolate mofetil. *Mod Pathol.* 2009;22(6):737–43.
- Tourret J, Willing BP, Dion S, MacPherson J, Denamur E, Finlay BB. Immunosuppressive treatment alters secretion of ileal antimicrobial peptides and gut microbiota, and favors subsequent colonization by uropathogenic *Escherichia coli*. *Transplantation.* 2017;101(1):74–82.
- Gibson CW, Childs-Kean LM, Naziruddin Z, Howell CK. The alteration of the gut microbiome by immunosuppressive agents used in solid organ transplantation. *Transp Infect Dis.* 2021;23:e13397.
- Taylor MR, Flannigan KL, Rahim H, Mohamud A, Lewis IA, Hirota SA, et al. Vancomycin relieves mycophenolate mofetil-induced gastrointestinal toxicity by eliminating gut bacterial  $\beta$ -glucuronidase activity. *Sci Adv.* 2019; 5(8):eaax2358.
- Flannigan KL, Taylor MR, Pereira SK, Rodriguez-Anguelo J, Moffat AW, Alston L, et al. An intact microbiota is required for the gastrointestinal toxicity of the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37(9):1047–59.
- Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol.* 2019;10:277.
- Tsukuda N, Yahagi K, Hara T, Watanabe Y, Matsumoto H, Mori H, et al. Key bacterial taxa and metabolic pathways affecting gut short-chain fatty acid profiles in early life. *ISME J.* 2021;15:1–17.
- Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belongue A, McWilliam Leitch C, Scott KP, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* 2014;8(6):1323–35.
- Zhang Z, Tang H, Chen P, Xie H, Tao Y. Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4(1):1–34.
- Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol.* 2002; 539(Pt 2):361.
- Myauchi S, Gopal E, Fel Y-J, Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor Down-regulated in Colon Cancer, as a Na<sup>+</sup>-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13299–6.
- Gill RK, Saksena S, Alrefal WA, Sarwar Z, Goldstein JL, Carroll RE, et al. Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Phys Cell Phys.* 2005;289:846–52.
- Brown AJ, Goldsworthy SM, Bames AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11312–9.
- Zhao Y, Chen F, Wu W, Sun M, Bilotta AJ, Yao S, et al. GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):752–62.
- Thangaraju M, Ciesci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, et al. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res.* 2009;69(7):2826.
- Le Poul E, Lolson C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in Polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 2003; 278(28):25481–9.
- Van Der Hee B, Wells JM. Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. *Trends Microbiol.* 2021;29:700–12.
- Rada-Iglesias A, Enroth S, Ameur A, Koch CM, Clelland GK, Respuela-Alonso P, et al. Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res.* 2007;17(6):708.
- Basson MD, Liu YW, Hanly AM, Emenaker NJ, Shenoy SG, Rothberg BEG. Identification and comparative analysis of human colonocyte short-chain fatty acid response genes. *J Gastrointest Surg.* 2000;4(5):501–12.
- Candido EPM, Reeves R, Davie JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell.* 1978;14(1):105–13.
- Sealy L, Chalkley R. The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell.* 1978;14(1):115–21.
- Xu WS, Pamigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007;26(37):5541–52.
- Schulthess J, Pandey S, Capitani M. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity.* 2019;50:432–445.e7.
- Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunker MK, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* 2011;13(5):517–26.
- Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci.* 2012;57(12):3126–35.
- Willemsen LEM, Koetsier MA, van Deventer SJH, van Tol EAF. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. *Gut.* 2003;52(10):1442.
- Lilley E, Stanford SC, Kendall DE, Alexander SPH, Cirino G, Docherty JR, et al. ARRIVE 2.0 and the British Journal of pharmacology: updated guidance for 2020. *Br J Pharmacol.* 2020;177(16):3611–6.
- Han J, Lin K, Sequelira C, Borchers CH. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2015;854:86–94.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–5.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw.* 2019;4(43):1686.
- Papadimitriou JC, Cangro CB, Lustberg A, Khaled A, Nogueira J, Willard A, et al. Histologic features of mycophenolate Mofetil-related colitis: a graft-versus-host disease-like pattern. *Int J Surg Pathol.* 2003;11(4):295–302.
- Lapis G, Boletis J, Skalloti C, Bamias G, Tsimaratos K, Patsouris E, et al. Histological spectrum of mycophenolate mofetil-related colitis: association with apoptosis. *Histopathology.* 2013;63(5):649–58.
- Heischmann S, Dzieciatkowska M, Hansen K, Leibfritz D, Christians U. The immunosuppressant Mycophenolic Acid Alters Nucleotide and Lipid Metabolism in an Intestinal Cell Model. *Sci Rep.* 2017;7:45088.
- Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9):1–18.

46. Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13780.
47. Park J, Kotani T, Konno T, Setiawan J, Kitamura Y, Imada S, et al. Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal Bacteria: role of short-chain fatty acids. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156334.
48. Lukovac S, Belzer C, Pellis L, Keijser BJ, de Vos WM, Montijn RC, et al. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. *MBio*. 2014;5:e01438–14.
49. Tan B, Luo W, Shen Z, Xiao M, Wu S, Meng X, et al. *Roseburia intestinalis* inhibits oncostatin M and maintains tight junction integrity in a murine model of acute experimental colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2019;54(4):432–40.
50. Ji J, Shu D, Zheng M, Wang J, Luo C, Wang Y, et al. Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. *Sci Rep*. 2016; 6:24838.
51. Tian Y, Xu Q, Sun L, Ye Y, Ji G. Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development. *J Nutr Biochem*. 2018;57:103–9.
52. Blik EM, Ugalde JA, Cousins J, Goddard AD, Richman J, Apte ZS. Microbial biotransformations in the human distal gut. *Br J Pharmacol*. 2018;175(24): 4404–14.
53. Washer GF, Schröter GP, Starzl TE, III RW. Causes of death after kidney transplantation. *JAMA*. 1983;250(1):49–54.
54. Stepanova M, Henry L, Gang R, Kalwaney S, Saab S, Younossi Z. Risk of de novo post-transplant type 2 diabetes in patients undergoing liver transplant for non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:175.
55. Liu F-C, Lin H-T, Lin J-R, Yu H-P. Impact of immunosuppressant therapy on new-onset diabetes in liver transplant recipients. *Ther Clin Risk Manag*. 2017; 13:1043–51.
56. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009;58(7):1509.
57. Zhang L, Du J, Yano N, Wang H, Zhao YT, Patricia D-S, et al. Sodium butyrate protects against high fat diet-induced cardiac dysfunction and metabolic disorders in type II diabetic mice HHS public access. *J Cell Biochem*. 2017;118(8):2395–408.
58. Severova-Andreevska G, Danilovska I, Sikole A, Popov Z, Ivanovski N. Hypertension after kidney transplantation: clinical significance and Therapeutical aspects. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(7):1241.
59. Wang L, Zhu Q, Lu A, Liu X, Zhang L, Xu C, et al. Sodium butyrate suppresses angiotensin II-induced hypertension by inhibition of renal (pro) renin receptor and intrarenal renin-angiotensin system. *J Hypertens*. 2017; 35(9):1899–908.
60. Cervera C, van Delden C, Gavaldà J, Welte T, Akova M, Carratalà J. Multidrug-resistant bacteria in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(s7):49–73.
61. Jin M, Zeng L, Zhang W, Deng X, Li J, Zhang W. Clinical features of multidrug-resistant organism infections in early postoperative solid organ transplantation in a single center. *Ann Palliat Med*. 2021;10(4):4555562–4562.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## II.9. Travail expérimental 3 : Étude des effets d'une supplémentation en SCFA pour la prise en charge de l'entéropathie induite par le MPA

Afin de limiter l'entéropathie liée au MPA, une stratégie en cours d'expérimentation au sein du laboratoire consiste à réduire la concentration intestinale de MPA en utilisant des inhibiteurs de la  $\beta$ -glucuronidase bactérienne. En effet, l'inhibition de l'hydrolyse du MPAG au sein du tractus intestinal réduirait la concentration locale de MPA dont l'accumulation digestive serait toxique pour les cellules épithéliales intestinales.

Notre objectif, ici, est de proposer une approche complémentaire pour restaurer l'homéostasie de la barrière épithéliale intestinale en évaluant les bénéfices d'une supplémentation en butyrate, l'un des SCFA le plus actif pharmacologiquement (**voir Chapitre I**). En effet, cet SCFA est connu pour être une source majeure d'énergie pour les entérocytes [8]. De plus, le butyrate a montré des effets bénéfiques lors de l'entéropathie induite au dextran sulfate de sodium (DSS) en restaurant l'expression d'une protéine de jonction au niveau intestinal, zonula occludens 1 (ZO1) [121]. Enfin, l'administration de butyrate dans l'eau de boisson de souris présentant une colite induite par *Clostridium difficile* entraîne une restauration de la barrière épithéliale intestinale [122]. Tout ceci nous montre le rôle bénéfique plausible d'une supplémentation en butyrate lors de l'entéropathie induite par le MPA. Dans le but d'atténuer cette toxicité gastro-intestinale, nous avons développé un modèle murin d'entéropathie précoce. Pour ce faire, différentes doses de MMF plus faibles que celle utilisée précédemment (900 mg/kg/j) ont été administrées à des souris. En effet, le modèle précédent est un modèle sévère d'entéropathie avec une complète déstructuration de l'épithélium digestif limitant ainsi l'étude de l'effet pharmacologique du butyrate sur l'entéropathie induite par le MPA. Les doses de 100 et 250 mg/kg/j sont des doses thérapeutiques non toxiques, enfin la dose de 500 mg/kg a été décrite comme induisant une entéropathie [116,123]. Après avoir caractérisé ce modèle d'entéropathie précoce, nous avons étudié les effets d'une supplémentation en butyrate dans l'eau de boisson.

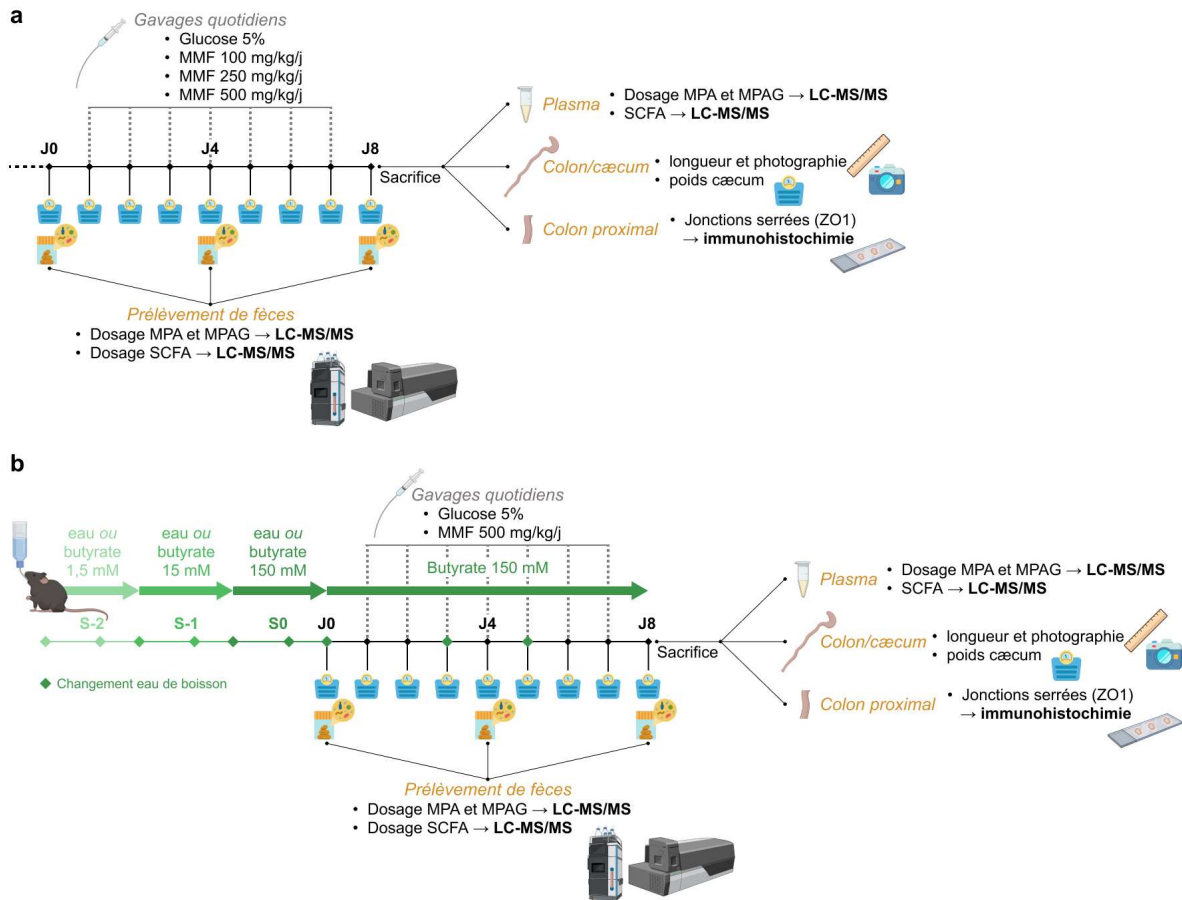
### II.9.1. Matériels et méthodes

#### II.9.1.1. Suivi et traitement des groupes expérimentaux

Les protocoles expérimentaux utilisant des animaux ont été planifiés et exécutés en conformité avec les principes éthiques en matière d'expérimentation animale et en stricte conformité avec le protocole APAFIS #38583-2022091614262843. Les procédures expérimentales impliquent des souris C57BL/6 au statut sanitaire exempt d'organisme pathogène spécifique (EOPS), âgées de 8 semaines et hébergées en animalerie protégée

pour garantir une moindre fluctuation de leur microbiote digestif et minimiser les perturbations liées aux contaminations externes.

Tout d'abord, 3 doses de MPA ont été choisies : 100, 250 et 500 mg/kg/j. Ces doses ont été délivrées quotidiennement par gavage à l'aide d'une canule de 20G pendant 7 jours à partir d'une formulation clinique pour perfusion du MPA qui contient du mycophénolate mofétil (MMF, Cellcept®) (**Figure 13a**). Les solutions de MMF ont été préparées à l'aide d'une solution de glucose 5% sous un environnement stérile. Pour des raisons pratiques, deux solutions de MMF ont été préparées à des concentrations de 10 et 25 mg/mL. En raison de problèmes de stabilité de la préparation dans le temps, il n'a pas été possible de préparer et conserver une solution de MMF à 50 mg/mL. Les souris du groupe contrôle ont été traitées avec une solution de glucose 5% et ont reçu une dose de 0,1 mL pour 10 g de poids corporel. Les souris du groupe traité à 100 et 250 mg/kg/j de MMF ont reçu une dose de 0,1 mL pour 10 g de poids corporel, d'une solution à 10 et 25 mg/mL, respectivement, tandis que les souris traitées avec 500 mg/kg/j ont reçu 0,2 mL pour 10 g de poids corporel de la solution à 25 mg/mL. Une répartition aléatoire en 4 groupes des souris a été réalisée pour les différentes doses à tester : groupe contrôle (soluté de glucose 5 %, n=6), groupe MMF 100 mg/kg/jour (n=6), groupe MMF 250 mg/kg/jour (n=6) et groupe MMF 500 mg/kg/jour (n=6).



**Figure 13 – Plan d’expérience pour le développement du modèle précoce d’entéropathie et la supplémentation en butyrate**

(a) La première phase consiste à développer, valider et standardiser le modèle d’entéropathie précoce liée au MPA. (b) La seconde phase consiste à étudier les effets d’une supplémentation en butyrate lors de l’entéropathie.

À la fin de cette première phase, nous avons dû choisir une dose de MMF qui induit une entéropathie sans pour autant affecter le bien-être animal. Pour cela nous avons regardé différents critères : le poids corporel, l’aspect macroscopique du bloc cæcum/côlon, une protéine de jonctions serrées et la concentration fécale en SCFA.

Afin d’étudier l’effet d’une supplémentation en butyrate, la dose de MMF choisie a été préparée et administrée dans les mêmes conditions que précédemment. Une répartition aléatoire en 4 groupes de souris a également été réalisée en fonction du traitement administré : groupe contrôle (soluté de glucose 5%, n= 8), groupe MMF (n= 8), groupe butyrate 150 mM (soluté de glucose 5%, n= 8) et groupe MMF + butyrate 150 mM (n= 8). Les animaux supplémentés en butyrate ont été habitués à boire des solutions de butyrate à partir de concentrations croissantes : 1 semaine à 1,5 mM, 1 semaine à 15 mM, et 1 semaine à 150 mM avant de débiter le traitement au MMF. Il est à noter que les biberons étaient placés sous



aluminium et changés tous les 2 ou 3 jours afin de s'assurer de la stabilité du butyrate et la consommation en eau a été évaluée dans les différents groupes de traitement (**Figure 13b** et **Annexe 3**).

Un nombre identique de souris femelles (n= 4/groupe) et mâles (n= 4/groupe) a été utilisé afin de limiter le biais d'interprétation lié au sexe. Dans le cadre du suivi expérimental, les poids des souris ont été mesurés chaque jour au moment de l'administration du MMF.

### **II.9.1.2. Prélèvement des échantillons**

Des échantillons de fèces de chaque souris ont été collectés aux jours 0, 4 et 8 et stockés à -80°C. Environ 20 min avant le sacrifice, une injection sous-cutanée d'un analgésique (kétoprofène à 20 mg/kg) a été effectuée afin de limiter la douleur lors de la ponction intracardiaque. Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (induction 3% et maintien 1,5%) et le sang périphérique a été prélevé par ponction du ventricule droit à l'aide d'une seringue à insuline 27G puis le plasma a été obtenu après centrifugation à 2 500 g pendant 10 min à 4°C, et stocké à -20°C. Avant de passer au prélèvement des organes, le sacrifice des animaux est réalisé par une dislocation cervicale. Différents organes ont été prélevés : la rate, qui a été pesée, le block cæcum/côlon, qui est photographié et mesuré, et le poids du cæcum est mesuré. Le côlon proximal a été isolé, enrobé de Tissue-Tek® O.C.T™ et placé dans un moule afin de procéder à l'immunomarquage de jonctions serrées.

### **II.9.1.3. Immunohistochimie des coupes de côlon proximal**

Les coupes transversales de 7 µm d'épaisseur de côlon proximal ont été réalisées grâce à un cryostat (Leica Biosystem) dans un environnement contrôlé de -20°C et ont été conservées à -80°C. Avant chaque immunomarquage, les coupes ont été séchées puis immergées dans un bain d'acétone pendant 10 min et réhydratées 15 min dans du PBS. Après 1h de saturation des lames avec du sérum de porc 10% – triton X-100 0,5% - PBS, les coupes ont été délimitées au feutre hydrophobe (PAP pen, Kisker Dutsher). Les anticorps primaires (anti-ZO1, PA5-28858, ThermoFisher) et secondaires (couplé à AlexaFluor 488, A32731, Invitrogen) ont été incubés, respectivement, durant la nuit à 4°C et 2h à température ambiante. Les anticorps en excès sont éliminés par lavages à l'aide d'une solution de PBS. Enfin, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec une solution de montage et de coloration au DAPI (ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI, P36931, Invitrogen). Les acquisitions des immunomarquages des coupes du côlon proximal ont été réalisées en mosaïque à l'aide d'un microscope droit à épifluorescence (Nikon Eclipse, plateforme BISCeM). Enfin, des images

plus détaillées des immunomarquages ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal (LSM880 ; plateforme BISCEm). Les images ont été quantifiées à l'aide du logiciel QuPath (version 0.4.3).

#### **II.9.1.4. Dosage du MPA et du MPAG dans les échantillons biologiques**

La méthode de dosage du MPA et du MPAG dans le plasma et les fèces a été développée et validée au cours de cette thèse.

##### **II.9.1.4.1. Dosage dans le plasma**

Afin de mesurer les concentrations plasmatiques de MPA et de MPAG chez les souris, une gamme étalon a été réalisée en surchargeant du plasma vierge (de 0,2 à 20 mg/L pour le MPA et de 0,05 à 5 mg/L pour le MPAG) (**Annexe 4**). 20 µL de chaque échantillon et point de gamme ont été mélangés à 150 µL d'une solution d'acétonitrile/acide formique (ACN/AF, 97/3) et 30 µL d'indométacine (étalon interne à 2,5 mg/L dans une solution d'ACN/AF, 97/3). Après homogénéisation du mélange, une centrifugation a été réalisée à 14 000 g pendant 5 min à 10°C. Le surnageant ainsi obtenu a été récupéré et transféré dans des vials pour analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

##### **II.9.1.4.2. Dosage dans les fèces**

Pour le dosage du MPA et MPAG dans les fèces, une gamme étalon a été préparée dans un mélange méthanol/eau (12/8, v/v ; de 0,2 à 20 mg/L pour le MPA et de 0,01 à 1 mg/L pour le MPAG) (**Annexe 5**). L'échantillon a été broyé dans une solution méthanol/eau 12/8 à raison de 20 µL pour 1 mg de fèces, homogénéisé pendant une durée de 30 s, puis introduit dans un sonicateur pendant 30 min et homogénéisé de nouveau pendant 30 s. Pour finir, les tubes ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 10°C. Enfin, les échantillons et les points de gamme ont été traités de la même manière que pour le dosage dans le plasma avant transfert en vials.

##### **II.9.1.4.3. Analyse des échantillons par LC-MS/MS**

Environ 150 µL des échantillons extraits ont été injectés sur un système LC Nexera 2 (Shimadzu) équipé d'une colonne XTerra® MS C8, 3,5 µm (2,1 mm×150 mm, Waters), thermostatée à 30°C et utilisant un gradient de phase A, 0,1% d'acide formique dans du formiate d'ammonium 2 mM dans l'eau et de phase B, un mélange d'acétonitrile et de phase A (90 :10, en volume), à un débit constant de 250 µl/min. La séparation chromatographique a été réalisée via un gradient de 9 min, programmé comme suit : 0-0,5 min, 10% de B ; 0,5-4 min, 10% à 100% de B ; 4-6,5 min, 100% de B ; 6,5-6,7 min, 100% à 10% de B ; 6,7-9 min,

rééquilibrage à 10% de B. La détection par spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse triple quadripolaire LCMS 8060 (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) fonctionnant en mode d'ionisation négative. Trois transitions MRM sont enregistrées pour chaque composé : la plus intense est utilisée pour la quantification (319,1 → 191,05 pour le MPA ; 495,15 → 319,1 pour le MPAG ; 356,1 → 312,1 pour l'étalon interne) tandis que les autres sont utilisées pour la confirmation. Les concentrations en MPA et MPAG sont déterminées par rapport à la gamme étalon.

### II.9.1.5. Dosage des SCFA dans les échantillons biologiques

#### II.9.1.5.1. Dosage dans le plasma

Une étape de déprotéinisation a été réalisée sur les échantillons de plasma avec une dilution au 1/3 dans de l'isopropanol froid (-20°C). Les échantillons ont été homogénéisés et centrifugés à 16 000 g pendant 15 min à 4°C. La gamme étalon a été préparée dans l'isopropanol froid avec des concentrations allant de 5 à 1000 µM pour l'acétate, de 0,25 à 50 µM pour le propionate et de 0,1 à 20 µM pour le butyrate (**Annexe 6**). Une étape de dérivation a été réalisée en ajoutant 50 µL d'échantillons ou de point de gamme, 50 µL de standards internes deutérés (D4-acétate 5 mM, D2-propionate 5 µM, D7-butyrate 20 µM), 20 µL de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC, dilué à 120 mM dans de la pyridine 6%/éthanol 96%) et 20 µL de 3-Nitrophenylhydrazine hydrochloride (3-NPH, dilué à 200 mM dans de l'eau/ACN 50/50). Les échantillons ont été incubés pendant 30 min à 40°C dans l'obscurité pour la réaction de dérivation. Enfin, 70 µL d'échantillons ou de points de gamme ont été dilués dans 100 µL d'une solution d'eau/acide formique 0,1%, puis centrifugé à 4 000 g durant 5 min à 4°C. Le surnageant a été transféré dans des vials pour une analyse en LC-MS/MS.

#### II.9.1.5.2. Dosage dans les fèces

Les fèces collectées aux jours 0, 4 et au 8 ont été pesées et 25 µL d'eau/acétonitrile 50/50 par mg de fèces ont été ajoutés puis une étape d'homogénéisation a été réalisée pendant 10 min. Ensuite, une étape de sonication a été effectuée pendant 10 min et les échantillons ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 10°C ; le surnageant a, par la suite, été récupéré. Une deuxième extraction a été effectuée dans les mêmes conditions que la première, et les surnageants ont été combinés. Une gamme étalon a été préparée dans de l'eau/acétonitrile 50/50 avec des concentrations allant de 10 µM à 5 mM pour l'acétate, de 1 à 500 µM pour le propionate et de 0,4 à 200 µM pour le butyrate (**Annexe 7**). Une étape de dérivation similaire à celle du dosage dans le plasma a été réalisée avec 50 µL d'échantillon

ou de point de gamme, 20 µL de standards internes deutérés (D4-acétate 500 mM, D2-propionate 20 mM, D7-butyrate 12,5 mM), 20 µL d'EDC à 120 mM et 20 µL de 3-NPH à 200 mM. Les échantillons ont été incubés pendant 30 min à 40°C dans l'obscurité. Les échantillons et les points de gamme dérivés ont été dilués au 1/20 dans de l'eau/acétonitrile 90/10 avant d'être transférés dans des vials en vue d'une analyse en spectrométrie de masse par LC-MS/MS.

#### **II.9.1.5.3. Analyse des échantillons par LC-MS/MS**

Les échantillons (1 µL pour les fèces et 5 µL pour les plasmas) ont été injectés sur une colonne Xselect HSS T3 XP 100Å 2,5 µm 2,1mmx100mm (Waters), thermostatée à 60°C et utilisant un gradient de phase A, 0,1% d'acide formique dans l'eau et de phase B, 0,1% d'acide formique dans du méthanol, à un débit constant de 200 µl/min. La séparation chromatographique a été réalisée via un gradient de 10 min, programmé comme suit : 0-0,5 min, 30% de B ; 0,5-5 min, 30% à 40% de B ; 5-5,5 min, 50 à 95% de B ; 5,5-7 min, 95 % de B ; 7-7,25 min, 95% à 30% de B ; 7,25-10 min, rééquilibration avec 30% de B. La détection par spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse triple quadripolaire LCMS 8060 (Shimadzu Corporation, Marne-la-Vallée, France) fonctionnant en mode d'ionisation négative. Quatre transitions MRM sont enregistrées pour chaque composé : la plus intense et spécifique est utilisée pour la quantification (194,4 → 137,05 pour l'acétate ; 197,5 → 137,1 pour le D4-acétate ; 208,4 → 137,05 pour le propionate ; 210,3 → 137,15 pour le D2-propionate ; 222,3 → 152,15 pour le butyrate ; 229,3 → 137,05 pour le D7-butyrate) tandis que les autres sont utilisées pour la confirmation. Les concentrations en SCFA sont déterminées par rapport à la gamme étalon.

#### **II.9.1.5.4. Analyses statistiques**

Les données collectées ont été analysées grâce au logiciel Prism5/GraphPad (version 5.01). Les résultats issus de la pesée quotidienne des souris et du dosage des SCFA dans les fèces ont été analysés avec un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un post-test de Bonferonni. Lorsque plus de 2 groupes sont comparés un test ANOVA à un facteur suivi d'un post-test de Bonferonni est effectué. Un test T de Student est réalisé pour la comparaison de 2 groupes.

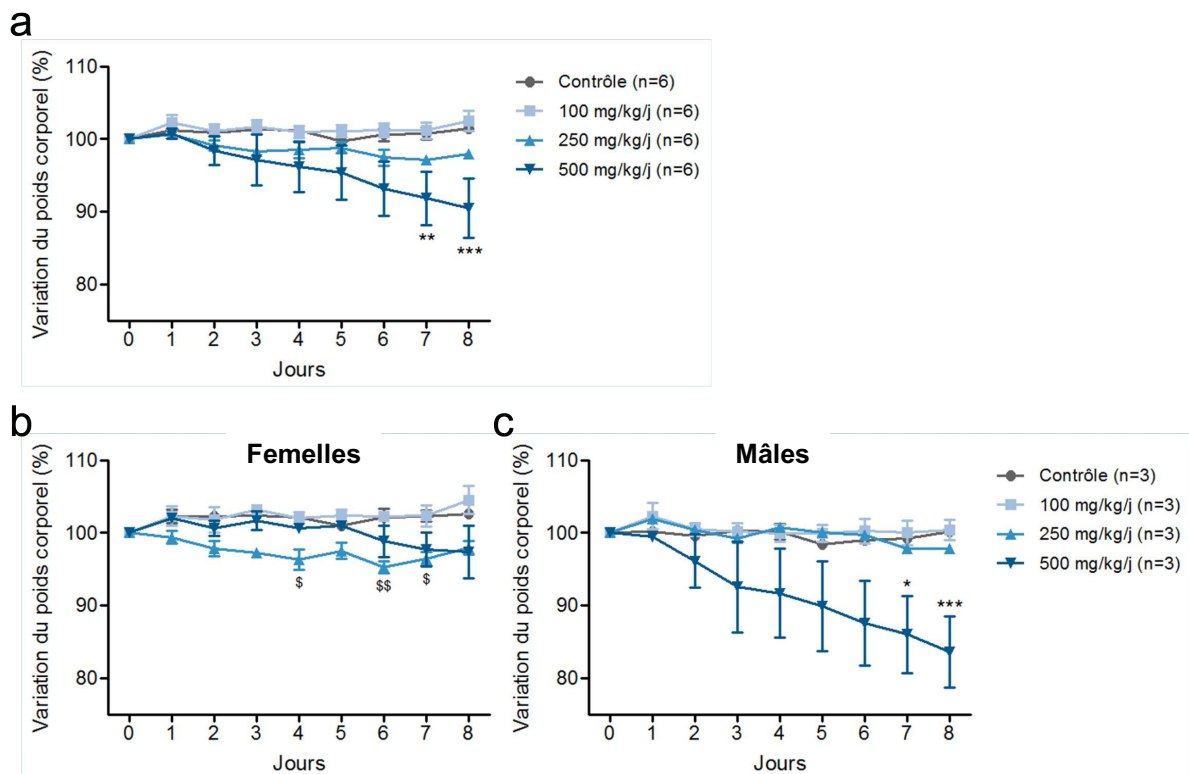
## II.9.2. Résultats

### II.9.2.1. Développement du modèle d'entéropathie précoce

#### II.9.2.1.1. Suivi des animaux et paramètres morphométriques

##### Poids corporel des animaux

Le traitement au MMF aux doses de 100 et 250 mg/kg/j n'entraîne pas de perte de poids. Cependant, les souris traitées à une dose de 500 mg/kg/j ont une perte de poids significative à partir du jour 7 d'environ 10% (**Figure 14a**). Il est à noter que la perte de poids est significativement différente chez les souris femelles traitées avec 250 mg/kg/j aux jours 4, 6 et 7 (**Figure 14b**). De plus, la perte de poids lors du traitement à 500 mg/kg/j est plus importante chez les mâles que chez les femelles (**Figure 14b et 14c**).

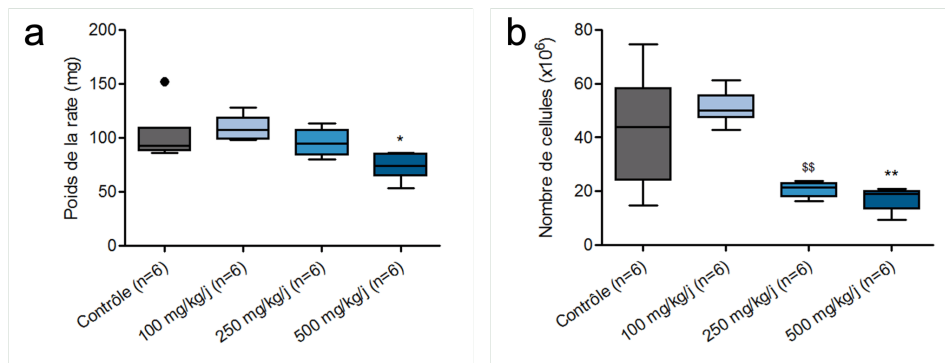


**Figure 14 – Variation du poids corporel (%) par rapport à J0**

Suivi de la variation du poids corporel (%) par rapport à J0 des groupes de toutes les souris traitées à différentes concentrations lors de la procédure expérimentale (a) et uniquement les femelles (b) ou uniquement les mâles (c). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 2 facteurs avec post-test de Bonferroni. \$, comparaison des groupes contrôle et 250 mg/kg/j ; \*, comparaison des groupes contrôle et 500 mg/kg/j. \$ ou \* :  $p < 0,05$  ; \$\$ ou \*\* :  $p < 0,01$  ; \$\$\$ ou \*\*\* :  $p < 0,001$ .

## Poids et nombre de cellules dans la rate

Le traitement au MMF a impacté de manière dose-dépendante le poids et le nombre de cellules de la rate. Les souris traitées à une dose de 500 mg/kg/j présentent un poids significativement inférieur par rapport aux souris du groupe contrôle (**Figure 15a**). Le nombre de cellules de la rate est également significativement diminuée dans les groupes des souris traitées à 250 et 500 mg/kg/j, par rapport aux souris du groupe contrôle (**Figure 15b**).

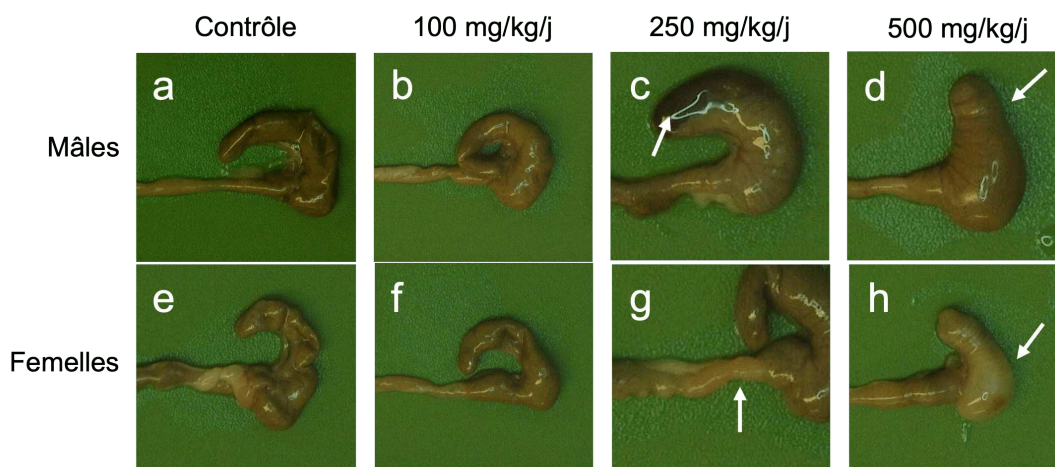


**Figure 15 – Poids et nombre de cellules de la rate**

Poids de la rate (mg) pesée au moment du sacrifice (a) et comptage du nombre de cellules après extraction (b). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni. \$, comparaison des groupes contrôle et 250 mg/kg/j ; \*, comparaison des groupes contrôle et 500 mg/kg/j. \$ ou \* :  $p < 0,05$  ; \$\$ ou \*\* :  $p < 0,01$ .

## Aspect du bloc cæcum/côlon

Après l'analyse visuelle du cæcum et du côlon, plusieurs phénomènes sont observés tels qu'une tâche sombre au niveau du cæcum (**Figure 16c**), ainsi qu'une inflammation du côlon proximal (**Figure 16g**) des souris traitées à 250 mg/kg/j de MMF. En plus de ces observations, les souris traitées avec 500 mg/kg/j de MMF présentent un gonflement et parfois des gaz dans le cæcum (**Figure 16d et 16h**).

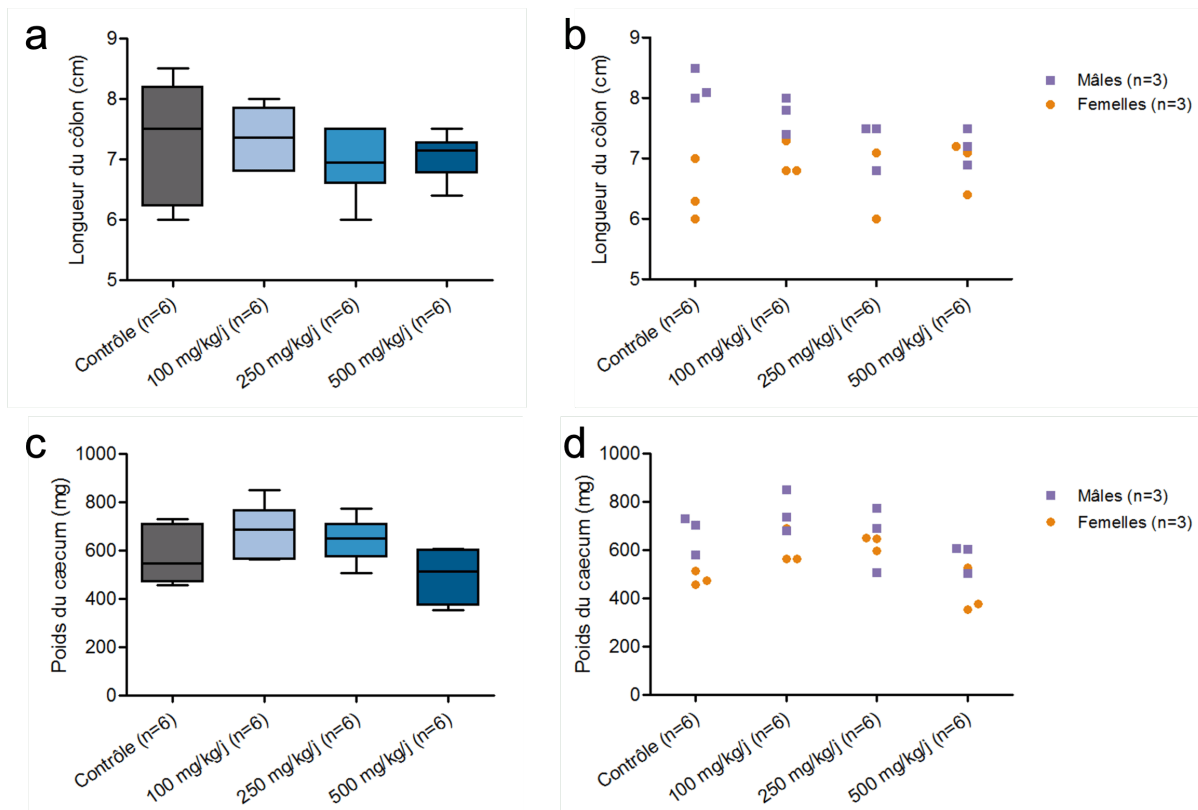


**Figure 16 – Photographies du cæcum et du côlon proximal**

Aspect du bloc cæcum/colon photographié au moment du sacrifice des souris mâles (a, b, c, d) et femelles (e, f, g, h) traitées avec les différentes doses de MMF.

## Longueur du côlon et poids du cæcum

Pour la longueur du côlon, aucune différence significative n'est observée (**Figure 17a**). Cependant, les souris mâles traitées avec 500 mg/kg/j de MMF semblent être plus atteintes avec une légère diminution de la longueur du côlon (**Figure 17b**). Le poids du cæcum diminue légèrement lorsque les concentrations de MMF augmentent (**Figure 17c**), à la fois chez les mâles et chez les femelles (**Figure 17d**).



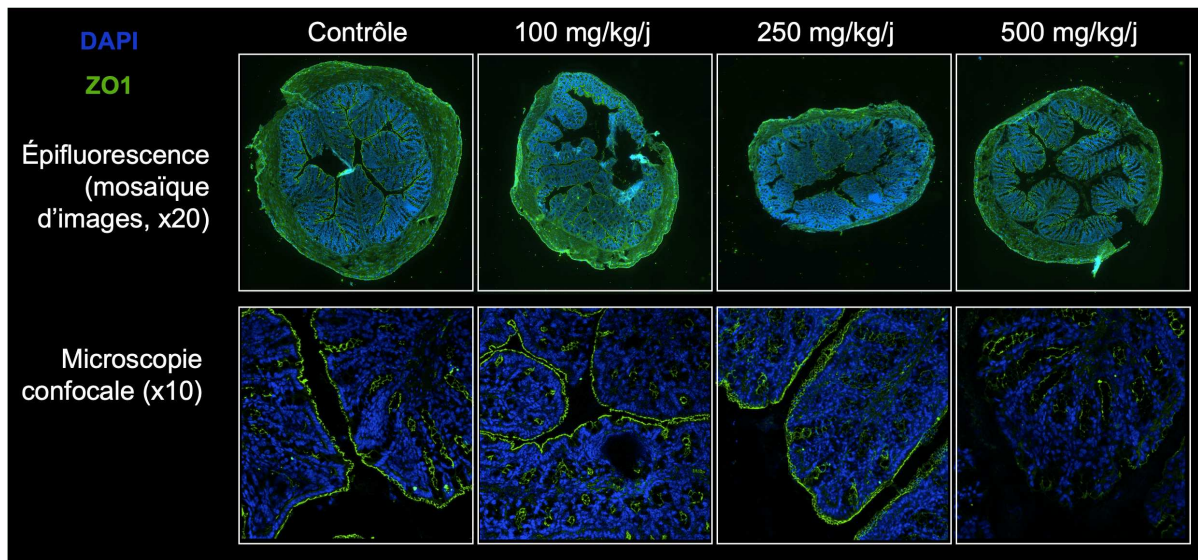
**Figure 17 – Longueur du côlon et poids du cæcum**

Analyse de la longueur du côlon (cm) des souris en fonction de la dose de MMF administrée (**a**), chez les mâles (en violet) et chez les femelles (en orange) (**b**). Mesure du poids du cæcum (mg) des souris en fonction de la dose de MMF administrée (**c**), chez les mâles (en violet) et chez les femelles (en orange) (**d**). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni.

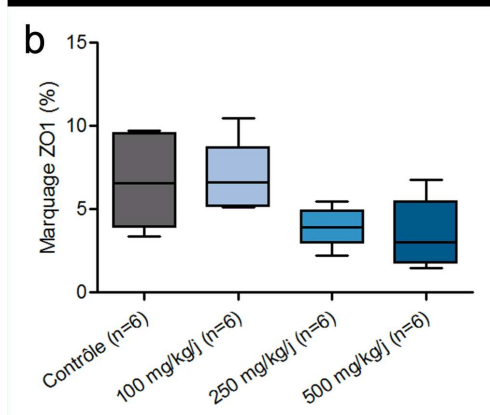
## Immunomarquages des jonctions serrées

Les immunomarquages d'une protéine de jonction serrée (ZO1) révèlent un marquage spécifique sur les villosités et les cryptes du côlon proximal des souris du groupe contrôle, MMF à 100 et 250 mg/kg/j. Cependant, le marquage est largement diminué au niveau des villosités mais reste présent au fond des cryptes pour les souris traitées avec une dose de 500 mg/kg/j de MMF (**Figure 18a**). La quantification du marquage ZO1 montre une légère diminution pour les souris traitées avec 250 et 500 mg/kg/j de MMF (**Figure 18b**).

a



b



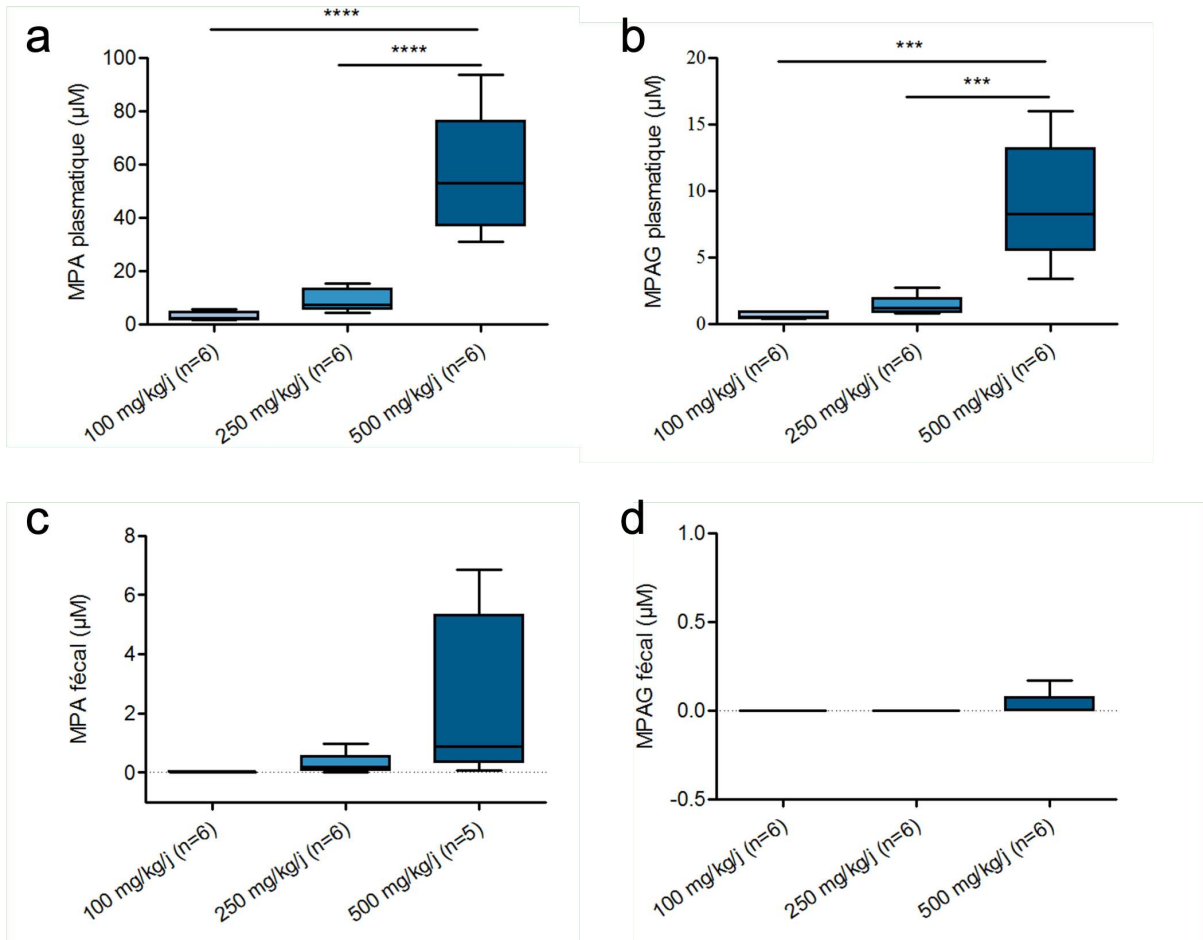
### Figure 18 – Immunomarquage de la protéine de jonction serrée, ZO1

Mosaïques d'images (x20) prises avec un microscope à épifluorescence ainsi qu'avec un microscope confocal (x10) (a). Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et ZO1 avec Alexa-488 (vert). Quantification du marquage de ZO1 (b). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferonni.

#### II.9.2.1.2. Dosage des métabolites du MMF

Les concentrations plasmatiques de MPA sont 20 et 7 fois plus augmentées chez les souris traitées avec 500 mg/kg/j de MMF par rapport aux souris traitées avec 100 et 250 mg/kg/j de MMF (Figure 19a). De la même manière, les concentrations plasmatiques de MPAG sont 15 et 6 fois plus augmentées chez les souris traitées avec 500 mg/kg/j de MMF par rapport aux souris traitées avec 100 et 250 mg/kg/j de MMF (Figure 19b). Pour les concentrations fécales de MPA et de MPAG, aucune différence significative n'est observée entre les groupes. Une légère augmentation est retrouvée chez les souris traitées avec 500 mg/kg/j de MMF (Figure 19c et 19d).





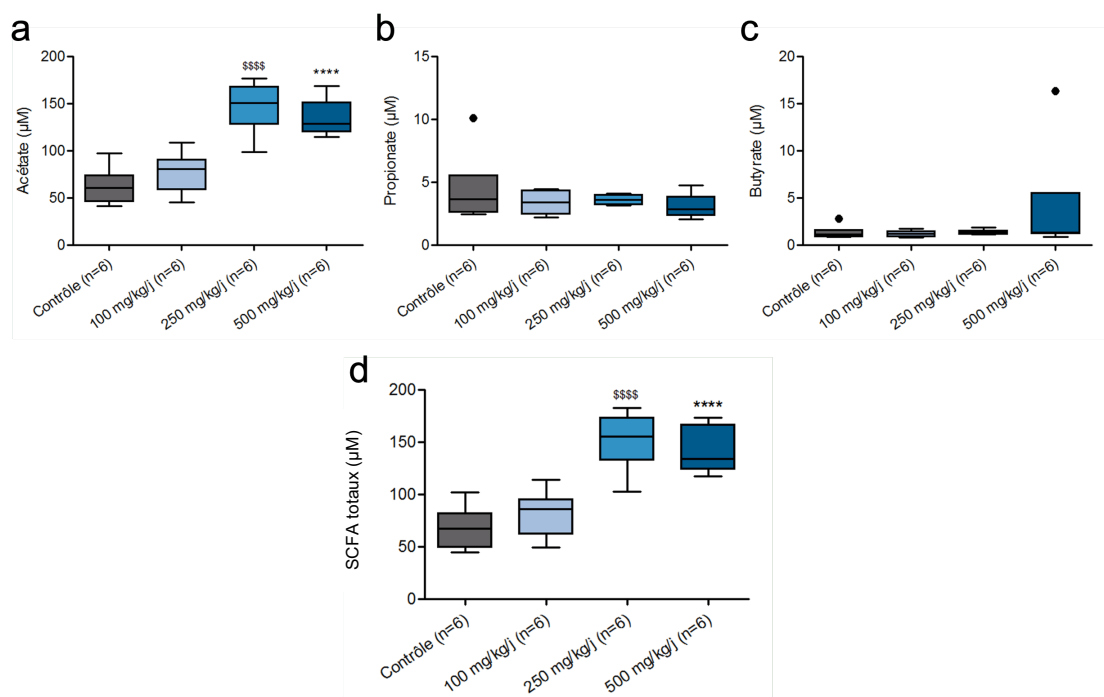
**Figure 19 – Concentrations en MPA et MPAG dans le plasma et les fèces**

Dosage du MPA (a) et du MPAG (b) dans le plasma. Dosage du MPA (c) et du MPAG (d) dans les fèces à J8. Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni. \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### II.9.2.1.3. Analyse du profil des SCFA

#### Analyse dans le plasma

Les souris traitées avec 250 et 500 mg/kg/j de MMF présentent une augmentation significative de la concentration d'acétate dans le plasma, tandis que les concentrations de propionate et de butyrate sont restées équivalentes à celles du groupe contrôle (**Figure 20**).

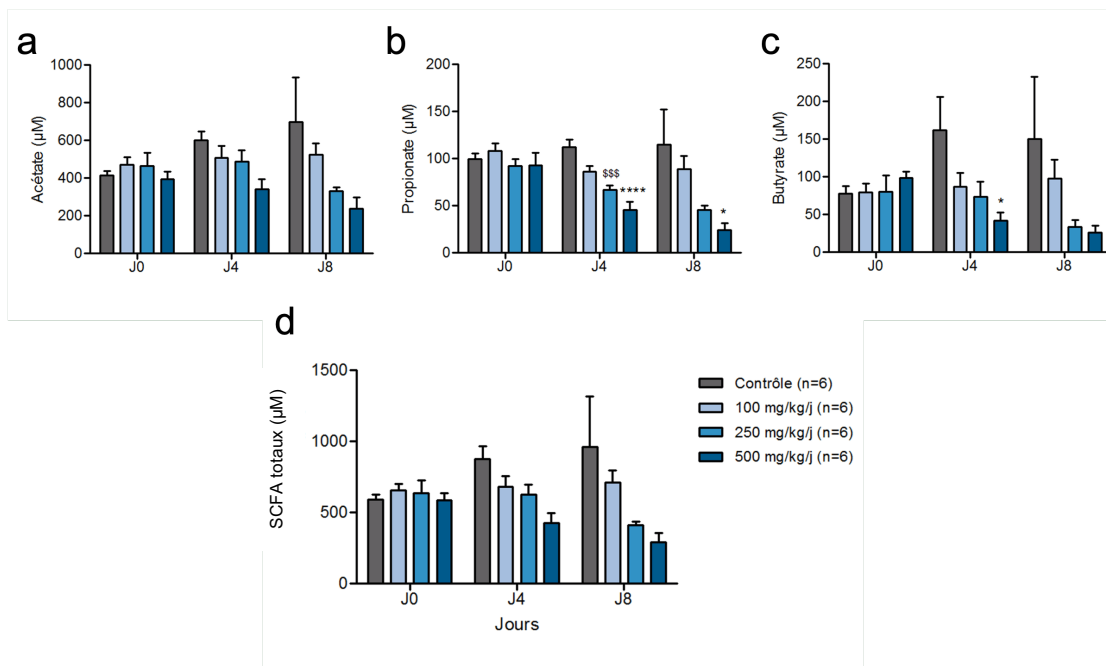


**Figure 20 – Dosage des SCFA dans le plasma des souris à J8**

Concentration des différents SCFA dans le plasma des souris à J8 : acétate (a), propionate (b), butyrate (c) et SCFA totaux (d). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni. \$, comparaison des groupes contrôle et 250 mg/kg/j ; \*, comparaison des groupes contrôle et 500 mg/kg/j. \$\$\$\$ ou \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### Analyse dans les fèces

La concentration fécale d'acétate diminue légèrement à J4 et J8 chez les souris traitées avec 500 mg/kg/j de MMF sans être statistiquement significative. La concentration en propionate diminue significativement à J4 et J8 dans les groupes 250 et 500 mg/kg/j de MMF. Pour le butyrate, une diminution significative est observée à J4 pour le groupe traité avec 500 mg/kg/j (Figure 21).



**Figure 21 – Évolution du profil des SCFA dans les fèces des souris à J0, J4 et J8**

Concentration des différents SCFA dans les fèces des souris à J0, J4 et J8 : acétate (a), propionate (b), butyrate (c) et SCFA totaux (d). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni. \$, comparaison des groupes contrôle et 250 mg/kg/j ; \*, comparaison des groupes contrôle et 500 mg/kg/j. \$\$\$ ou \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### II.9.2.2. Conclusion sur le modèle expérimental

Cette première partie consistait à développer, valider et standardiser un modèle murin d'entéropathie liée au MPA imitant les stades précoces. Pour ce faire, nous avons testé 3 doses différentes de MMF afin d'induire l'entéropathie : 100, 250 et 500 mg/kg/j administrées quotidiennement par gavage. La variation de poids, les paramètres morphométriques (aspect du bloc cæcum/côlon, poids du cæcum, longueur du côlon), l'état des jonctions serrées, le dosage des métabolites du MMF ainsi que le profil des SCFA nous ont permis d'évaluer l'entéropathie liée au MPA (Tableau 1). En effet, les souris traitées au MMF à 500 mg/kg/j présentent une importante perte de poids, une légère diminution de la longueur du colon montrant une atteinte de l'homéostasie du tube digestif, ainsi qu'un aspect anormal du cæcum (accumulation de gaz, taches sombres) qui peut être le signe d'une dysbiose. En effet, chez la souris, au niveau du cæcum se trouve la plus forte concentration bactérienne qui participe à la digestion des aliments [124]. De plus, l'analyse des immunomarquages de ZO1 nous montre une altération de la barrière épithéliale intestinale lorsque les souris sont traitées avec 500 mg/kg/j de MMF. L'augmentation des SCFA au niveau systémique peut également être le signe d'une atteinte de la barrière intestinale avec comme résultat une augmentation de la perméabilité intestinale causée par le traitement au MMF. Enfin, l'analyse du profil des SCFA

fécaux nous indique une altération fonctionnelle du microbiote avec une diminution de ces différents SCFA pouvant être le signe d'une dysbiose intestinale.

Au vu de ces différents résultats, nous retenons la dose de 500 mg/kg/j de MMF qui induit une entéropathie précoce. Cette dose va nous servir dans un second temps à tester les effets bénéfiques d'une supplémentation en butyrate pour prévenir la survenue des atteintes gastro-intestinales.

**Tableau 1 – Paramètres évaluant l'entéropathie liée au MPA**

	Contrôle	100 mg/kg/jour de MMF	250 mg/kg/jour de MMF	500 mg/kg/jour de MMF
Poids corporel	Vert	Vert	Vert	Rouge
Aspects macroscopiques du bloc cæcum/côlon	Vert	Vert	Orange	Rouge
Longueur du côlon	Vert	Vert	Orange	Orange
Poids du cæcum	Vert	Vert	Vert	Orange
Protéines de jonctions serrées (ZO1)	Vert	Vert	Orange	Rouge
Physiologie de la rate	Vert	Vert	Orange	Rouge
Concentration en AGCC	Vert	Orange	Rouge	Rouge

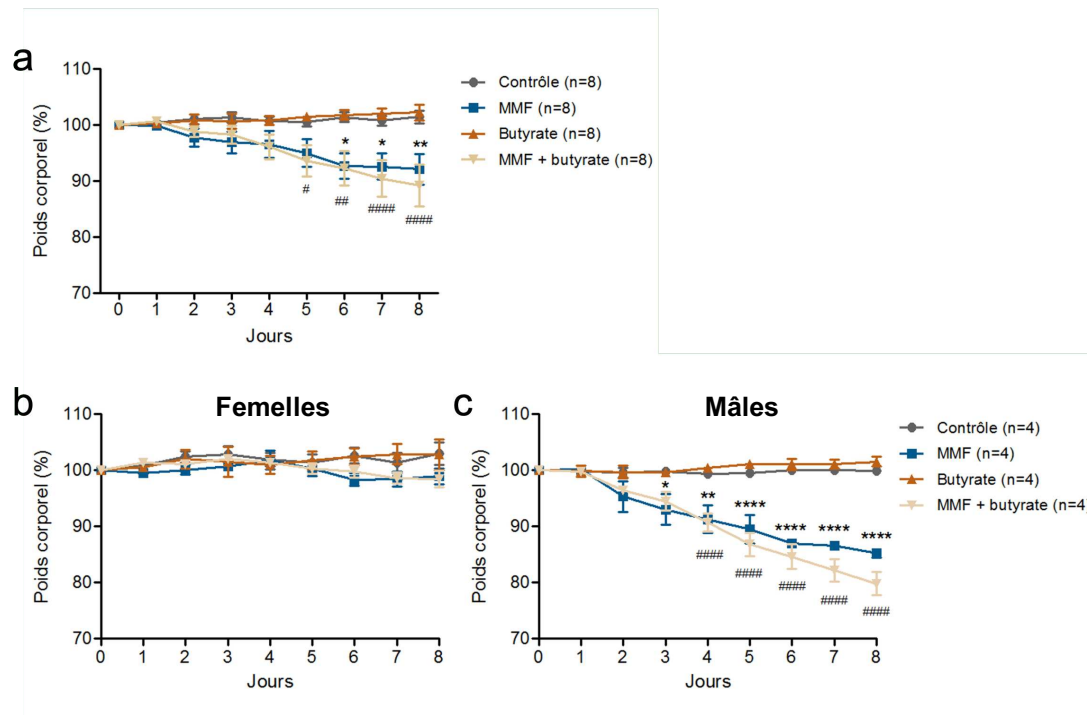
Vert : pas d'altération ; orange : altération modérée ; rouge : altération

### II.9.2.3. Effet de la supplémentation en butyrate dans un modèle d'entéropathie précoce

#### II.9.2.3.1. Suivi des animaux et paramètres morphométriques

##### *Poids corporel des animaux*

Après 8 jours de traitement, les souris traitées avec 500 mg/kg/j de MMF présentent une perte de poids d'environ 10% comme lors de la première phase (**Figure 22a**). La supplémentation en butyrate n'empêche pas la perte de poids provoquée par le traitement au MMF. En effet, une diminution significative du poids corporel est également observée chez les souris traitées au MMF et supplémentées en butyrate. De plus, les souris supplémentées exclusivement en butyrate ne présentent pas de variation de poids par rapport aux souris contrôles. De la même manière, les souris mâles sont les plus touchées par le traitement au MMF (**Figure 22b** et **22c**).

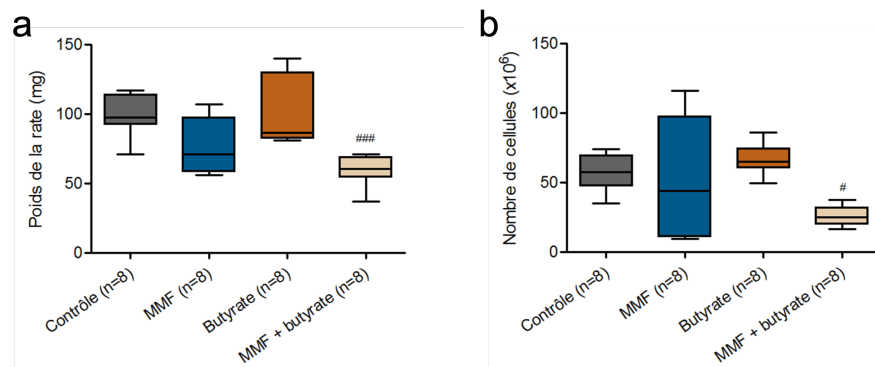


**Figure 22 – Variation du poids corporel (%) par rapport à J0**

Suivi de la variation du poids corporel (%) par rapport à J0 des groupes de toutes les souris traitées (a) et uniquement les femelles (b) ou uniquement les mâles (c). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 2 facteurs avec post-test de Bonferonni. \*, comparaison des groupes contrôle et MMF ; #, comparaison des groupes butyrate et MMF+butyrate. # ou \* :  $p < 0,05$  ; ## ou \*\* :  $p < 0,01$  ; #### ou \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### Poids et nombre de cellules dans la rate

Le poids et le nombre de cellules de la rate sont identiques entre les souris du groupe contrôle et celles du groupe supplémenté en butyrate seul (Figure 23). Une diminution non significative du poids de la rate ainsi que des variations dans le nombre de cellules sont observées dans le groupe traité au MMF. Le groupe MMF + butyrate présente une diminution significative du poids et du nombre de cellules de la rate par rapport au groupe butyrate.

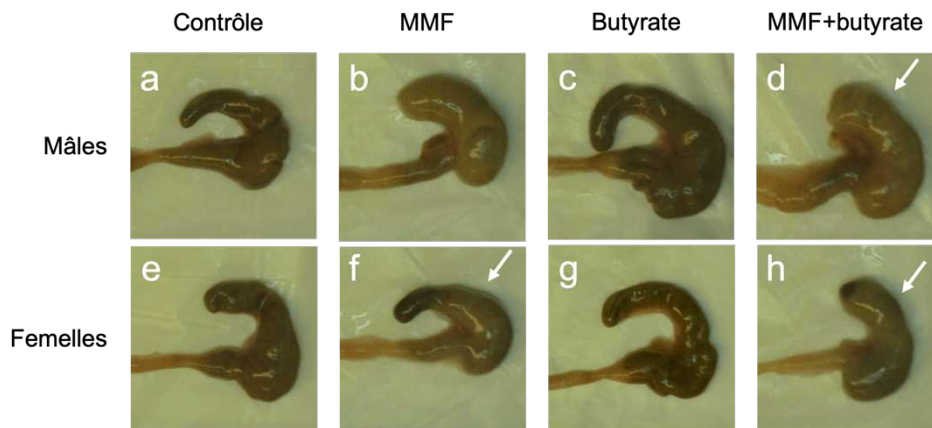


**Figure 23 – Poids et nombre de cellules de la rate**

Poids de la rate pesée (mg) au moment du sacrifice (a) et nombre de cellules contenues dans la rate (b). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferonni. #, comparaison des groupes butyrate et MMF+butyrate. # :  $p < 0,05$  ; ### :  $p < 0,001$ .

### Aspect du bloc cæcum/côlon

Les observations phénotypiques du bloc cæcum/côlon semblent montrer les mêmes effets chez les souris traitées au MMF et supplémentées en butyrate que chez les souris traitées par du MMF uniquement (**Figure 24**). En effet, un cæcum gonflé, une tache sombre et une vascularisation importante du cæcum sont des caractéristiques retrouvées dans les deux groupes.

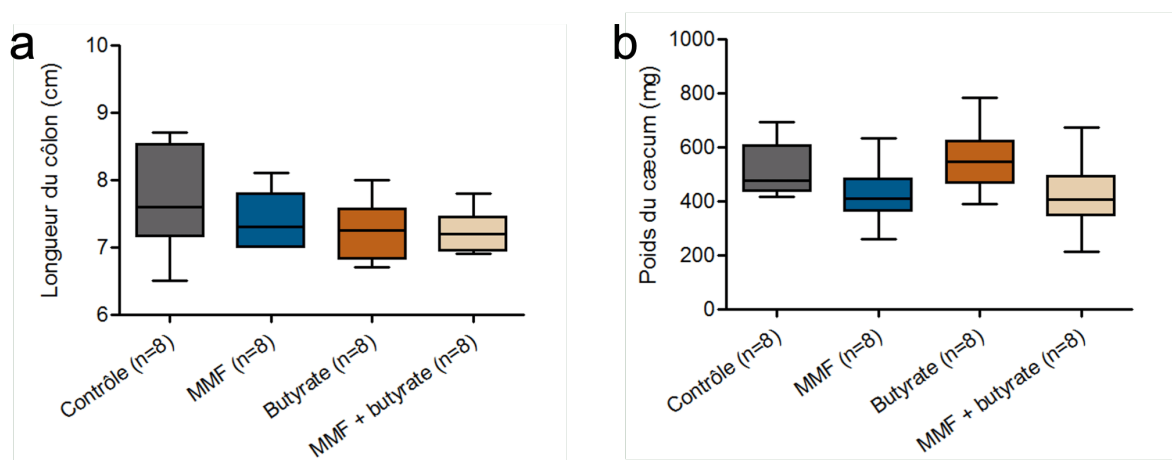


**Figure 24 – Photographies du cæcum et du côlon proximal**

Aspect du bloc cæcum/colon photographié au moment du sacrifice des souris mâles (a, b, c, d) et femelles (e, f, g, h).

### Longueur du côlon et poids du cæcum

La longueur du côlon est identique entre tous les groupes (**Figure 25a**). De plus, le poids du cæcum du groupe contrôle est semblable à celui du groupe butyrate seul. Enfin, une légère diminution du poids du cæcum est observée pour le groupe MMF et celui MMF + butyrate en comparaison avec le groupe contrôle et butyrate, respectivement (**Figure 25b**).



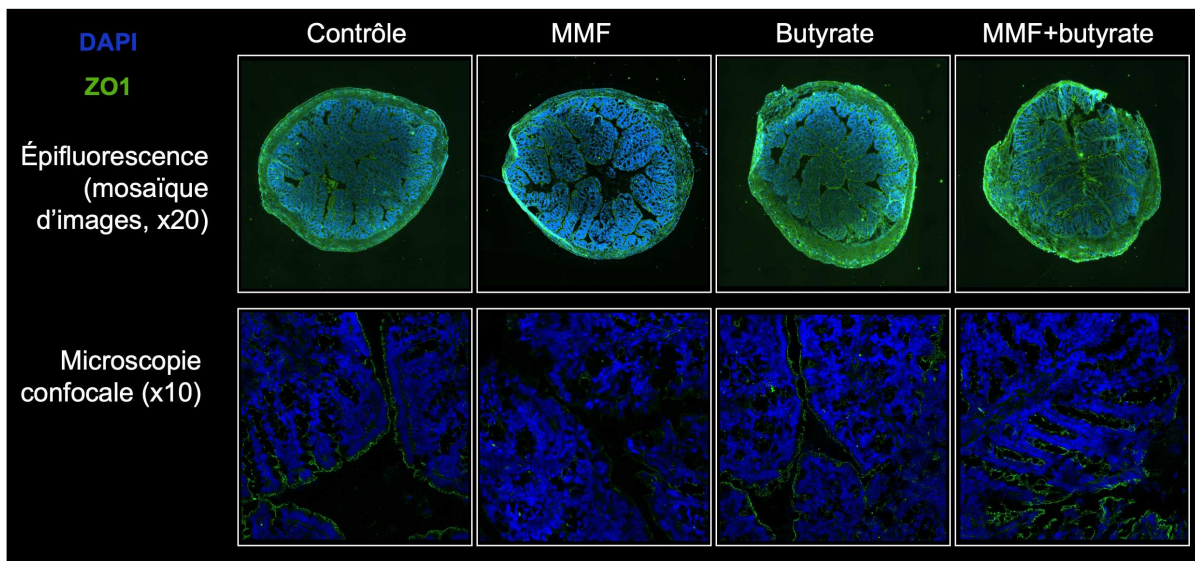
**Figure 25 – Longueur du côlon et poids du cæcum**

Analyse de la longueur du côlon (cm) (a) et du poids du cæcum (mg) (b) des souris en fonction du traitement administré. Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA.

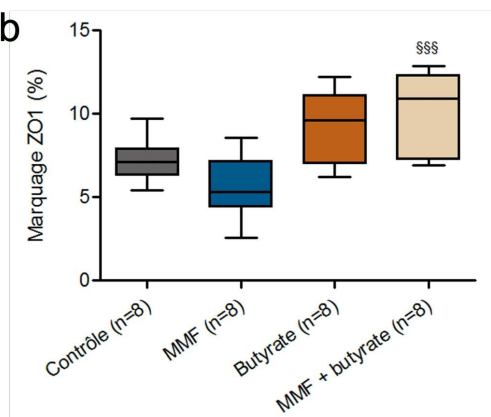
## Immunomarquage des jonctions serrées

Un marquage continu et spécifique est observé sur les coupes de côlon proximal chez les souris du groupe contrôle et celles du groupe supplémenté en butyrate (**Figure 26a**). De plus, le marquage est absent au niveau des villosités des coupes de côlon des souris traitées au MMF. Enfin, le marquage de ZO1 est fortement présent au niveau des cryptes et villosités des souris du groupe MMF + butyrate. Concernant la quantification, une augmentation significative du marquage de ZO1 est présente chez les souris traitées au MMF et supplémentées en butyrate, en comparaison avec le traitement au MMF (**Figure 26b**).

a



b

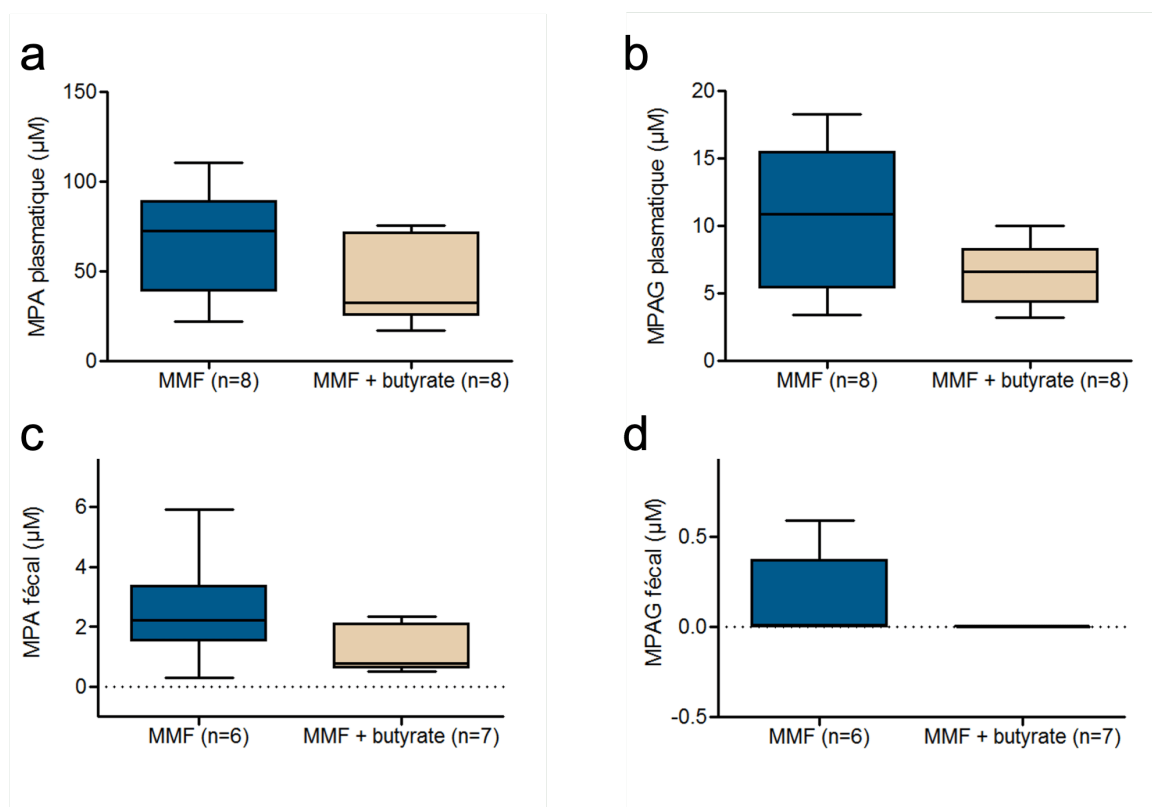


### Figure 26 – Immunomarquage de ZO1

Mosaïques d'images (x20) prises avec un microscope à épifluorescence ainsi qu'avec un microscope confocal (x10) (a). Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et ZO1 avec Alexa-488 (vert). Quantification du marquage de ZO1 (b). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni. §§§ :  $p < 0,001$ .

### II.9.2.3.2. Dosage des métabolites du MMF

Au niveau plasmatique, une tendance à la diminution du MPA et du MPAG est observée chez les souris supplémentées en butyrate et traitées au MMF, en comparaison avec les souris du groupe MMF (**Figure 27a** et **27b**). La même observation est faite au niveau fécal (**Figure 27c** et **27d**).



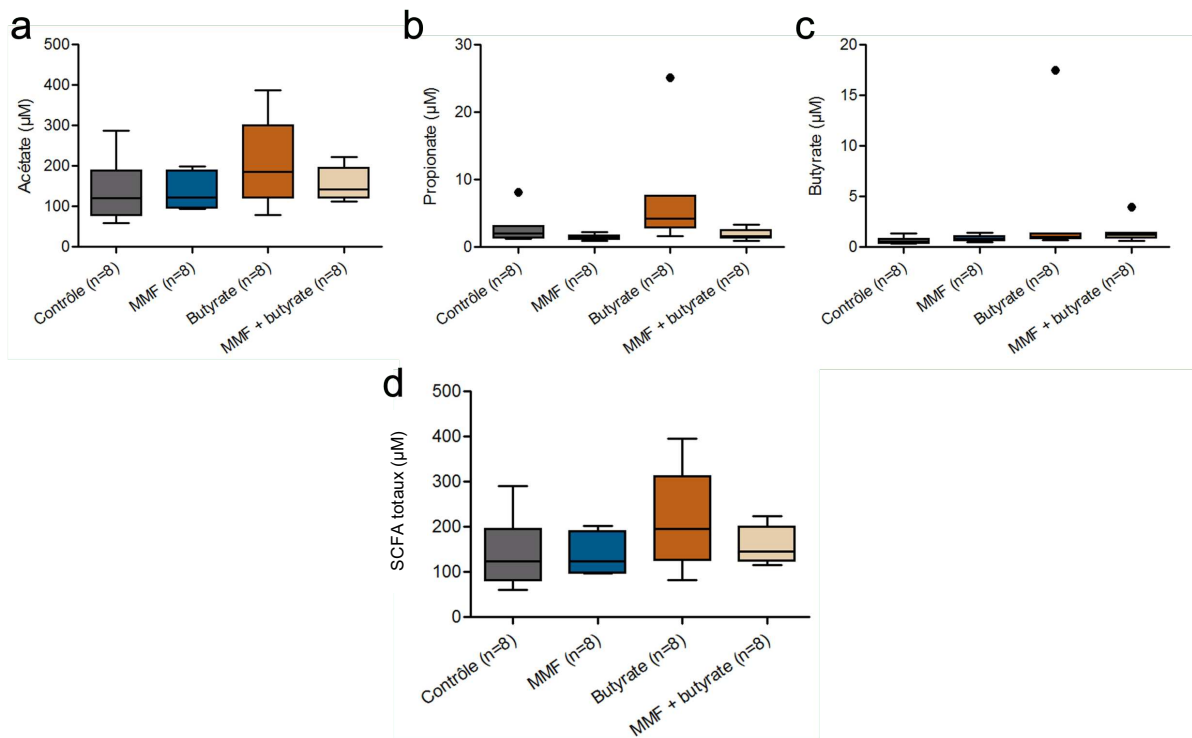
**Figure 27 – Concentrations en MPA et MPAG dans le plasma et les fèces**

Dosage du MPA (a) et du MPAG (b) dans le plasma. Dosage du MPA (c) et du MPAG (d) dans les fèces à J8. Les résultats ont été analysés avec un test T de Student non-apparié. *Données manquantes pour le dosage des fèces dues à la difficulté de récupérer plusieurs échantillons de fèces au même moment.*

### II.9.2.3.3. Analyse du profil des SCFA

Aucune différence significative n'est observée pour le dosage des différents SCFA dans le plasma. Une légère augmentation en acétate et en propionate est à noter pour les souris supplémentées en butyrate (**Figure 28**).

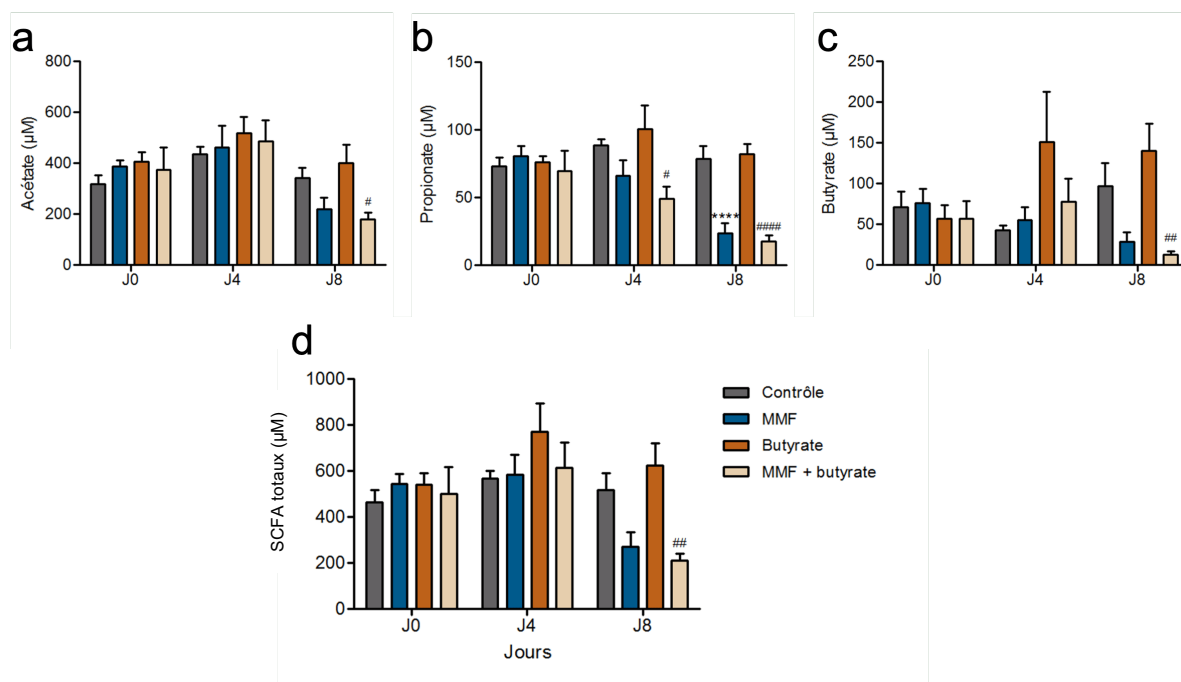




**Figure 28 – Dosage des SCFA dans le plasma des souris à J8**

Concentration des différents SCFA dans le plasma des souris à J8 : acétate (a), propionate (b), butyrate (c) et SCFA totaux (d). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni.

En ce qui concerne les SCFA dans les fèces, les concentrations en acétate et en butyrate sont significativement diminuées après 8 jours de traitement dans le groupe MMF + butyrate (Figure 29a et 29c). La concentration en propionate est retrouvée altérée aux jours 4 et 8 pour les groupes MMF et MMF + butyrate (Figure 29b). Enfin, au niveau des SCFA totaux, la concentration est significativement réduite après 8 jours de traitement pour le groupe MMF+butyrate (Figure 29d).



**Figure 29 – Évolution du profil des SCFA dans les fèces des souris à J0, J4 et J8**

Concentration des différents SCFA dans les fèces des souris à J0, J4 et J8 : acétate (a), propionate (b), butyrate (c) et SCFA totaux (d). Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni. \*, comparaison des groupes contrôle et MMF ; #, comparaison des groupes butyrate et MMF+butyrate. # ou \* :  $p < 0,05$  ; ## ou \*\* :  $p < 0,01$  ; #### ou \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### II.9.3. Discussion

Au cours de ce travail expérimental, nous avons pu développer, valider et standardiser un modèle murin d'entéropathie précoce induite par le MPA. En effet, le modèle précédemment publié induisait une entéropathie sévère avec une déstructuration complète de l'épithélium digestif et une altération fonctionnelle du microbiote [125]. Le modèle développé ici présente une perte de poids inférieure à 10%, ce qui est attendu dans un modèle d'entéropathie. Dans ce modèle expérimental, les souris mâles semblent être largement plus atteintes que les femelles. En effet, les mâles avaient un poids supérieur aux femelles et des études ont montré que le traitement au MMF pouvait induire une altération lipidique ainsi qu'une diminution du tissu adipeux [126–128]. De plus, le MMF à 500 mg/kg/j induit une réduction du poids et du nombre de cellules de la rate, qui est un organe lymphoïde largement impliqué dans la réponse immunitaire [129]. Cela démontre que le MMF exerce dans ces conditions son effet immunosuppresseur. Lors du développement de ce modèle, nous avons observé une accumulation de MPA dans les parties basses du tube digestif. En effet, le MPA est normalement largement absorbé dans les parties hautes du tube digestif lors de sa conversion à partir de la prodrogue, le MMF [130,131]. L'accumulation de MPA, au plus près des cellules épithéliales intestinales, peut entraîner une déstructuration de l'épithélium digestif

caractérisée dans nos investigations par une atteinte des protéines de jonctions (ZO1), comme montré ici. Nous avons pu également montrer que le traitement avec de fortes concentrations de MPA induit une altération de la prolifération des cellules épithéliales intestinales (**Annexe 8**). Cette désorganisation peut mener à une augmentation de la perméabilité intestinale que nous avons observé chez des patients transplantés traités au MPA (**voir Travail expérimental 1**). Ici, nous avons pu mettre en évidence dans la première phase, mais pas dans la seconde, l'augmentation systémique de métabolites bactériens au niveau systémique (SCFA). Cependant, à l'heure actuelle, nous n'avons pas pu quantifier les LPS au niveau systémique. De plus, notre modèle possède des anomalies structurelles au niveau du cæcum avec la présence d'une tache sombre également observée dans des modèles de colites induites par le DSS [132,133]. Nous avons également observé des poches de gaz qui pourraient être le résultats d'une dysbiose avec une augmentation du nombre de bactéries productrices de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) [134]. Enfin, notre modèle d'entéropathie précoce présente une altération fonctionnelle du microbiote digestif avec une réduction de la quantité de SCFA, altérations que nous avons également observé dans notre modèle publié d'entéropathie sévère [125].

Par la suite, nous avons testé une nouvelle stratégie préventive en ciblant le microbiote digestif basée sur une supplémentation en butyrate. Pour cela, notre modèle expérimental d'entéropathie précoce a été supplémenté en butyrate dans l'eau de boisson. Cette stratégie de supplémentation a été choisie car des études ont montré les bénéfices du butyrate sur l'homéostasie de la barrière intestinale [121,122]. Les effets pharmacologiques du butyrate pourraient donc permettre de contrecarrer les effets délétères du MPA sur la barrière intestinale. Cependant, dans ce modèle précoce d'entéropathie induite par le MPA, il a été montré que la supplémentation en butyrate dans l'eau de boisson n'a pas réussi à corriger les dommages associés à cette entéropathie. Lors de la supplémentation, le butyrate n'empêche pas la perte de poids des souris traitées au MMF. Grâce à la mesure du poids de la rate, nous avons pu montrer que le butyrate n'altère pas les propriétés immunosuppressives du MMF lors du co-traitement. L'aspect phénotypique des cæca et des côlons de ces souris n'est pas foncièrement différent des souris traitées au MMF. Au niveau histologique, les souris traitées au MMF présentent une altération du marquage de ZO1 au niveau des villosités, là où le MPA est fortement au contact des cellules épithéliales. De façon intéressante, la supplémentation en butyrate a permis une redistribution de ZO1 sur les villosités intestinales lors du co-traitement. Le butyrate semble donc avoir un effet au niveau de l'homéostasie intestinale sans pour autant contrôler le phénomène d'entéropathie. La redistribution des protéines de jonction le long des villosités pourrait être une conséquence directe de la diminution du MPA au niveau colique. En effet, lors de la supplémentation en butyrate, nous avons observé une diminution

de la concentration plasmatique et fécale de MPA et de MPAG. Le butyrate pourrait donc avoir un effet sur la pharmacocinétique du MMF notamment en modifiant l'expression de certains transporteurs au niveau de la bile. Au niveau de l'étude du microbiote fonctionnel, le butyrate n'entraîne pas la restauration des différents SCFA. Le butyrate est un SCFA qui est utilisé comme source d'énergie par les colonocytes [8], cela explique peut-être pourquoi nous ne retrouvons pas d'augmentation de butyrate aux niveaux fécal et systémique.

Afin d'envisager la supplémentation en butyrate dans le but de limiter l'entéropathie induite par le MPA, il serait intéressant de réaliser une approche combinant cette supplémentation et un inhibiteur de  $\beta$ -glucuronidases bactériennes. Cette stratégie permettrait de limiter les désordres gastro-intestinaux en inhibant la déconjugaison du MPAG en MPA actif. L'inhibition de la  $\beta$ -glucuronidase bactérienne par l'amoxapine, a été rapportée bénéfique dans un modèle de colite induite par l'irinotécan, un anticancéreux, qui permet le remodelage de toute la barrière épithéliale intestinale [135]. De plus, nous avons pu démontrer que le co-traitement de l'amoxapine avec le MMF diminue l'exposition intestinale au MPA et prévient les lésions gastro-intestinales (**Annexe 9**).

## II.10. Conclusion et perspectives du chapitre 2

L'acide mycophénolique (MPA) est l'un des immunosuppresseurs les plus utilisés en transplantation et dans les maladies auto-immunes. Ce médicament anti-rejet inhibe l'activation des lymphocytes T et B en bloquant la synthèse d'ADN entraînant ainsi une extinction du système immunitaire. Cependant, des désordres gastro-intestinaux sont retrouvés chez plus de 30% des patients transplantés et traités au MPA. Chez ces patients, les praticiens diminuent ou arrêtent le traitement au MPA dans le but de réduire les effets indésirables gastro-intestinaux. Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la compréhension des mécanismes sous-jacents impliqués dans la toxicité liée au MPA. Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur l'impact du traitement au niveau de l'homéostasie de la barrière intestinale. En effet, de récents travaux, montrent une altération de la barrière épithéliale ainsi que des variations du microbiote digestif (dysbiose) lors de traitements au MPA [114–117].

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil plasmatique de certains métabolites bactériens chez des patients traités au MPA un an après transplantation. Ce travail a permis de démontrer que les patients transplantés et traités au MPA sont susceptibles de développer une perméabilité intestinale. Cela pouvant entraîner des désordres métaboliques, tels que l'hypertension artérielle ou encore le diabète (**Annexe 10**) qui sont des co-morbidités dont l'incidence augmente en période post-transplantation. De plus, nous avons pu mettre en place un score utilisant des métabolites bactériens de petite taille, les acides gras à chaîne courte (SCFA) et des produits bactériens de grande taille, les lipopolysaccharides (LPS) permettant de discriminer différents stades de la perméabilité intestinale. Lors de ce travail, nous avons émis l'hypothèse que le MPA est responsable de la déstructuration de la barrière intestinale, cependant, les patients transplantés sont traités avec plusieurs immunosuppresseurs (*e.g.*, inhibiteurs de la voie de la calcineurine, de mTOR, anticorps monoclonaux) et ainsi que d'autres classes de médicaments (*e.g.*, corticostéroïdes, antibiotiques). Des études complémentaires viseraient à établir le profil des différents métabolites bactériens (LPS et SCFA) dans une cohorte de patients non transplantés traités au MPA (*e.g.*, cohorte de patients atteints d'une maladie auto-immune).

Par la suite, nous avons exploré le microbiote digestif dans des modèles murins d'entéropathie induits par le MPA. Tout d'abord, afin de mimer les stades sévères de l'entéropathie, un modèle murin a été développé avec de fortes doses de mycophénolate mofétil (MMF, prodrogue du MPA). Ce modèle murin présente une déstructuration de l'architecture du côlon et nous avons pu démontrer pour la première fois l'altération de la production des SCFA au niveau intestinal induit par un traitement au MPA. Dans un second temps, nous avons mis au point un modèle murin d'entéropathie modéré avec de plus faibles

doses de MMF. Ce traitement induit une dégradation modérée des jonctions serrées au niveau des cellules épithéliales intestinales ainsi qu'une altération de la production des SCFA au niveau intestinal. Puis, ce modèle a été utilisé afin de tester une stratégie thérapeutique préventive de l'entéropathie liée au MPA en supplémentant les souris en butyrate. Cet SCFA est décrit comme le plus actif pharmacologiquement et présente des récepteurs sur la plupart des cellules [136]. Cette supplémentation, dans notre modèle, ne semble pas atténuer les lésions morphométriques du cæcum ni les altérations de la production des SCFA intestinaux. Cependant, la supplémentation permet une meilleure redistribution des jonctions serrées du côlon proximal et ainsi, peut-être, une amélioration de la barrière intestinale. Afin d'aller plus loin dans l'utilisation de ce modèle d'entéropathie précoce, l'utilisation d'inhibiteurs de la  $\beta$ -glucuronidase est envisagée afin de contrôler la déconjugaison du MPAG en MPA actif et toxique au niveau des cellules épithéliales intestinales.

Enfin, dans des perspectives chez l'Homme, l'analyse de la barrière intestinale (e.g., cellules, microbiote, IgA) est envisagée par des prélèvements fécaux de patients transplantés sous MPA. De plus, une analyse longitudinale de patients transplantés pourrait être réalisée afin d'étudier les changements métabonomiques (métabolites de l'hôte et du microbiote) que peut induire le protocole d'immunosuppression.

## Chapitre III. Acides gras à chaîne courte comme modulateurs du système immunitaire

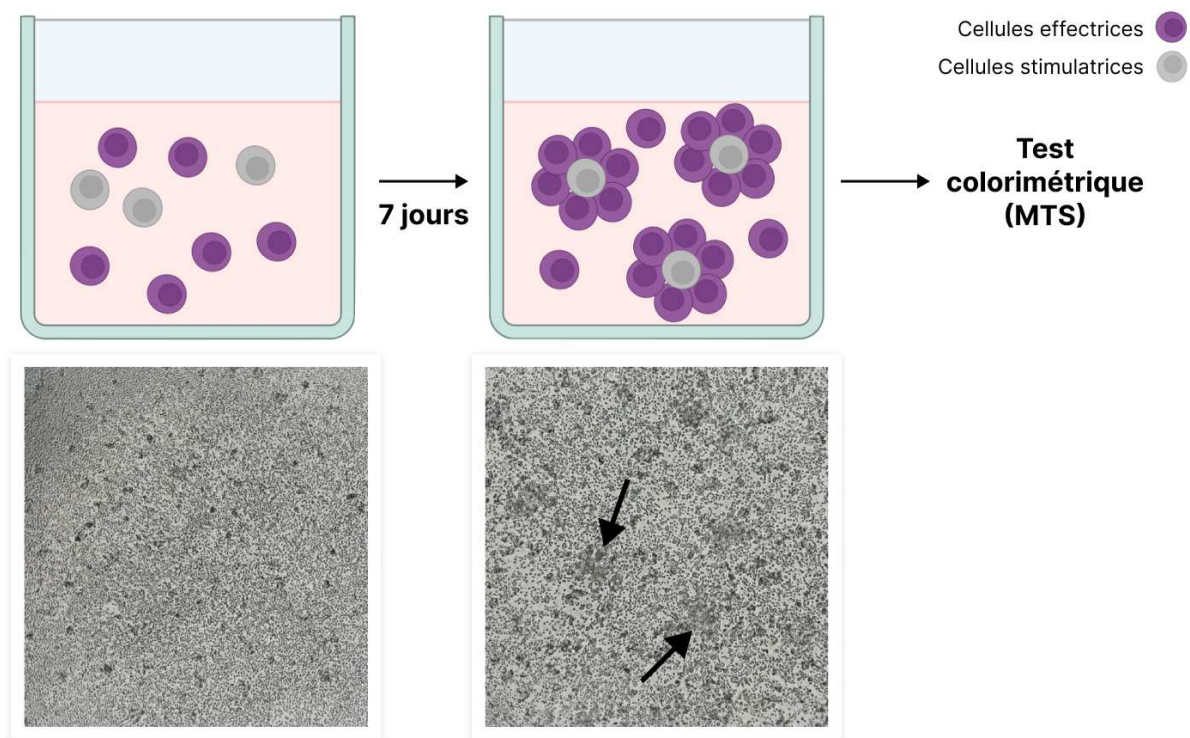
---

Les acides gras à chaîne courte (SCFA) sont des métabolites produits par le microbiote digestif à partir des fibres alimentaires non digérées par l'hôte. Ces SCFA sont pharmacologiquement actifs puisqu'ils possèdent des transporteurs à la surface des cellules épithéliales intestinales et également des récepteurs à la surface de divers types cellulaires (e.g., muscle, cerveau, système immunitaire). Nous avons également pu décrire, dans un article d'hypothèse, le rôle potentiel des SCFA dans la résolution de l'inflammation en s'appuyant sur la modulation du système immunitaire lors de l'orage cytokinique au cours de l'infection au SARS-CoV-2 (**Annexe 11**). De façon similaire, au sein de ce chapitre, nous allons nous intéresser au potentiel rôle immunomodulateur des SCFA au cours de la transplantation. Les SCFA, comme précédemment décrit, possèdent des effets non négligeables sur la modulation du système immunitaire. En effet, ces SCFA (acétate, propionate et butyrate) peuvent avoir des fonctions anti-inflammatoires sur les cellules de l'immunité innée et adaptative. Ces cellules se retrouvent fortement impliquées lors des épisodes de rejet de greffe pouvant impacter négativement la survie du greffon. Cependant, les effets des SCFA varient en fonction de la concentration, de la durée d'exposition et des modèles étudiés. C'est pour cela que des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents des SCFA sur l'homéostasie des cellules de l'immunité. Lors de ce chapitre nous avons analysé les effets du butyrate au cours d'une réaction lymphocytaire mixte. Puis, nous avons développé une méthode de supplémentation au niveau systémique en SCFA dans un modèle murin d'allogreffe de peau. Enfin, pour des études complémentaires, et afin d'évaluer l'effet de la supplémentation en SCFA dans un contexte de transplantation, nous avons développé, standardisé et validé un modèle murin de greffe de peau.

### III.1. Réaction lymphocytaire mixte avec le butyrate

Afin d'évaluer le rôle immunomodulateur des SCFA, nous avons effectué des expériences de réaction lymphocytaire mixte (RLM). Le principe de la RLM est décrit en **Figure 30**. Pour cela, nous avons analysé l'effet du butyrate, l'un des SCFA, sur une co-culture de cellules mononucléées périphériques du sang (PBMC) de 2 donneurs incompatibles. En effet, il a été démontré que le butyrate possède des récepteurs à la surface de certaines cellules lymphocytaires [137]. De plus, cet SCFA entraîne une différenciation des lymphocytes T (LT) en lymphocytes T régulateurs (LTreg) qui permettent la régulation de la balance entre les lymphocytes pro- et anti-inflammatoires [138–141].

La prolifération de cellules effectrices en contact avec cellules stimulatrices (allogéniques), traitées à la mitomycine, a été évaluée par un test colorimétrique afin de suivre l'activation de la réponse immunitaire dans des conditions basales, en présence de tacrolimus à différentes doses (0,1 à 10 ng/mL) puis en présence de butyrate. Ici, nous avons utilisé des concentrations en butyrate proches de celles retrouvées au niveau systémique chez l'Homme (2-20  $\mu$ M) ainsi que de plus fortes concentrations (200  $\mu$ M et 2 mM).



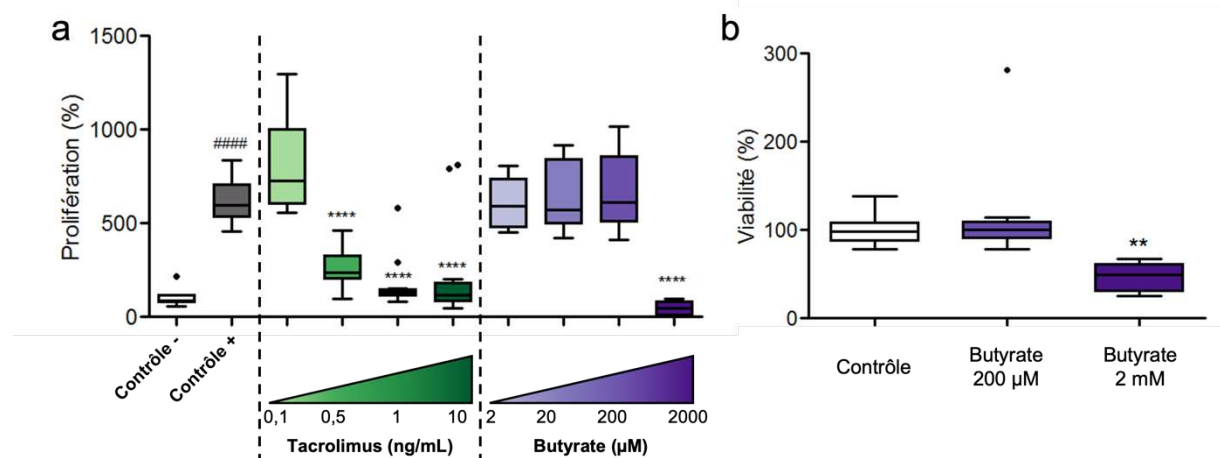
**Figure 30 – Principe de la méthode de réaction lymphocytaire mixte**

Des cellules effectrices ont été mises en co-culture avec des cellules stimulatrices traitées à la mitomycine (bloque le cycle cellulaire) pour un ratio de 2 :1, respectivement. Les cellules effectrices ont proliféré durant 7 jours et forment des amas de prolifération (flèches noires). À la fin des 7 jours, un test afin d'évaluer la prolifération a été effectué par un test colorimétrique (MTS).

Les résultats nous montrent une activation de la prolifération en présence des cellules allogéniques qui est inhibée de manière dose dépendante avec le tacrolimus (**Figure 31a**). Les cellules prolifèrent lorsqu'elles sont traitées avec 2, 20 et 200  $\mu$ M de butyrate. Cependant, la prolifération des cellules traitées avec 2 mM de butyrate est fortement inhibée, et se retrouve au niveau du contrôle négatif. Le butyrate étant un acide, nous avons par la suite étudié la viabilité de ces cellules avec les concentrations à 200  $\mu$ M et 2 mM et nous pouvons observer une diminution de la prolifération avec 2 mM. Cela nous indique que le butyrate est toxique à de fortes concentrations pour les cellules lymphocytaires (**Figure 31b**). En effet, le butyrate est décrit comme pouvant inhiber la prolifération de cellules cancéreuses colorectales [142]. Nous avons pu montrer ici que le butyrate n'inhibe pas la prolifération des cellules stimulées



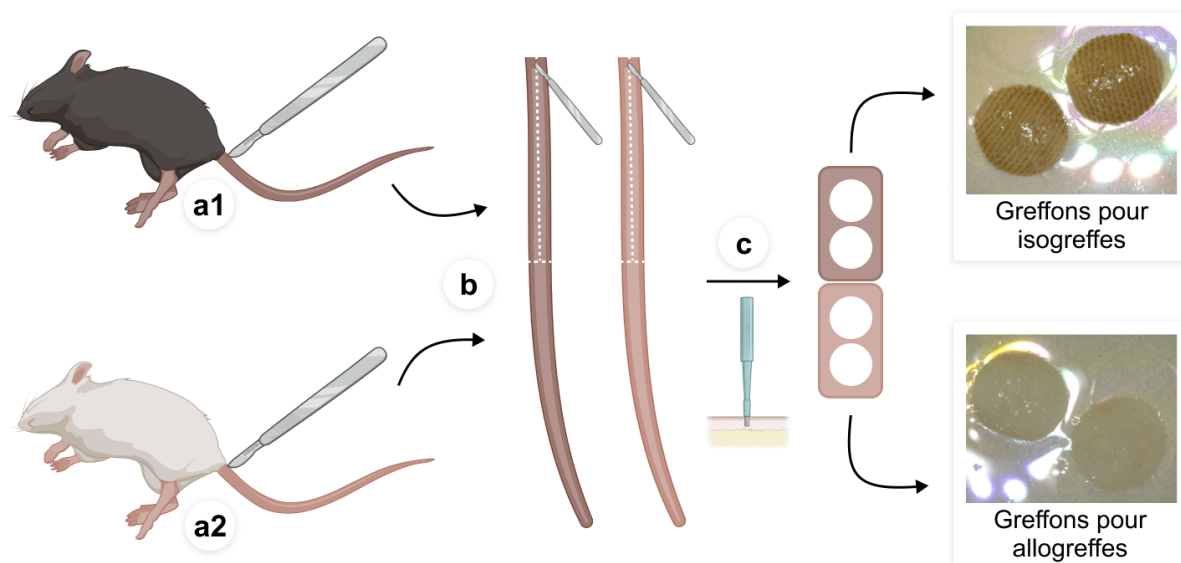
dans un contexte allogénique. Des tests complémentaires de RLM pourraient être envisagés dans un milieu contenant des cytokines permettant la différenciation en Treg (e.g., IL2, TGF- $\beta$ ) en co-traitement avec du butyrate, ou encore un cocktail de SCFA [143,144].



**Figure 31 – Prolifération et viabilité cellulaire lors d'une expérience de RLM en présence de butyrate**  
**(a)** Le contrôle - a été réalisé avec des cellules stimulatrices traitées ou non à la mitomycine. Le contrôle + et les autres conditions ont été réalisées avec des cellules stimulatrices et effectrices (traitées à la mitomycine). Les cellules en co-culture ont été traitées durant 7 jours avec des concentrations croissantes de tacrolimus et de butyrate, puis un test colorimétrique (MTS) a été réalisé. Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 1 facteur avec post-test de Bonferroni. #, comparaison au contrôle - ; \*, comparaison au contrôle +. ##### ou \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ . **(b)** La viabilité a été analysée avec uniquement les cellules stimulatrices à plus forte densité en présence ou non de butyrate. Les résultats ont été analysés avec un test T de Student non apparié. \*\* :  $p < 0,01$ . Deux analyses indépendantes ont été réalisées avec  $n=6$  dans chaque expérience.

### III.2. Développement du modèle de greffe de peau

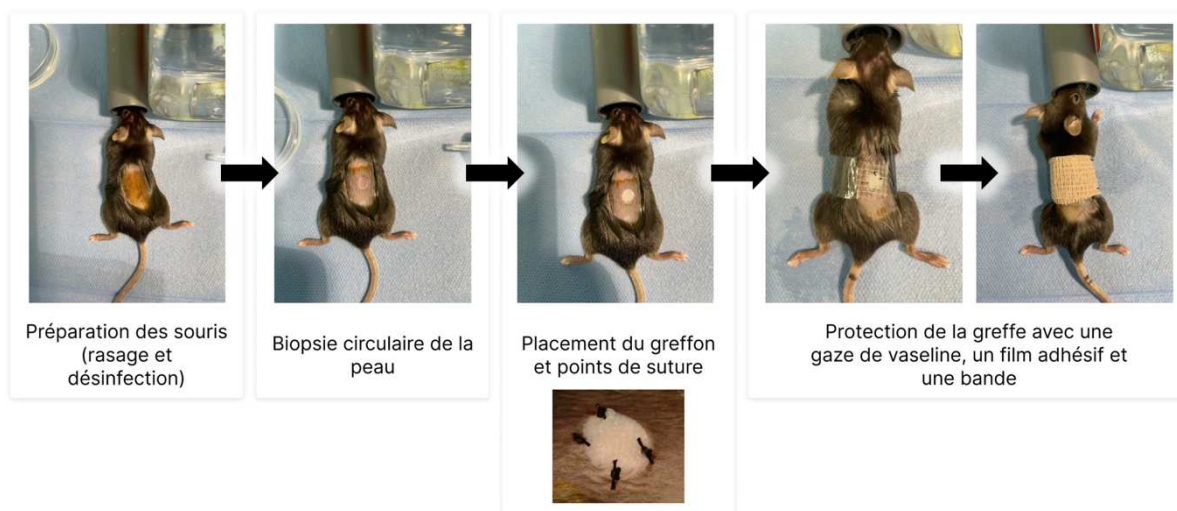
Dans le but d'étudier l'effet de la supplémentation en SCFA sur le devenir du greffon, nous avons développé, validé et standardisé un modèle murin de greffe de peau. Ce modèle a été développé à partir de la peau de queue de souris greffée sur le dos d'une autre souris. Des contrôles de validation du modèle, et de l'acceptation du greffon ont été réalisés en effectuant des isogreffes (greffes entre individus génétiquement identiques). Pour cela, nous avons utilisé des greffons issus d'une souris mâle donneuse de fond génétique C57BL/6 (souris noire) que nous avons greffé sur une souris femelle receveuse de même fond génétique. En parallèle, nous avons effectué des allogreffes (greffes entre individus génétiquement différents) mimant le rejet aigu. Pour ces greffes, nous avons utilisé des souris mâles donneuses de fond génétique BALB/c (souris blanche) que nous avons greffé sur des souris femelles receveuses de fond génétique C57BL/6. Le protocole de greffe de peau a été adapté de Pakyari *et al.* [145]. Brièvement, les souris donneuses ont été euthanasiées afin de prélever leur queue et le greffon qui a été prélevé de manière circulaire à l'aide d'un emporte-pièce (**Figure 32**).



**Figure 32 – Procédure de récupération des greffons**

(a) Les souris donneuses sont euthanasiées par dislocation cervicale (souris C57BL/6 pour une isogreffe **a1** et souris BALB/C pour une allogreffe **a2**). (b) La queue est prélevée et la peau est récupérée après une incision verticale puis horizontale. (c) Les greffons sont récupérés de manière circulaire à l'aide d'un emporte-pièce et conservés dans du PBS.

Par la suite, une injection d'antalgique (buprénorphine 0,1 mg/kg en sous-cutané) a été effectuée aux souris receveuses environ 20 min avant la chirurgie. Les souris receveuses ont été anesthésiées, rasées et une portion de peau équivalente à la taille de la pièce à greffer a été prélevée afin d'y insérer le greffon. Des points de sutures ont été réalisés et la greffe a été protégée par un pansement durant 6 jours (**Figure 33**).

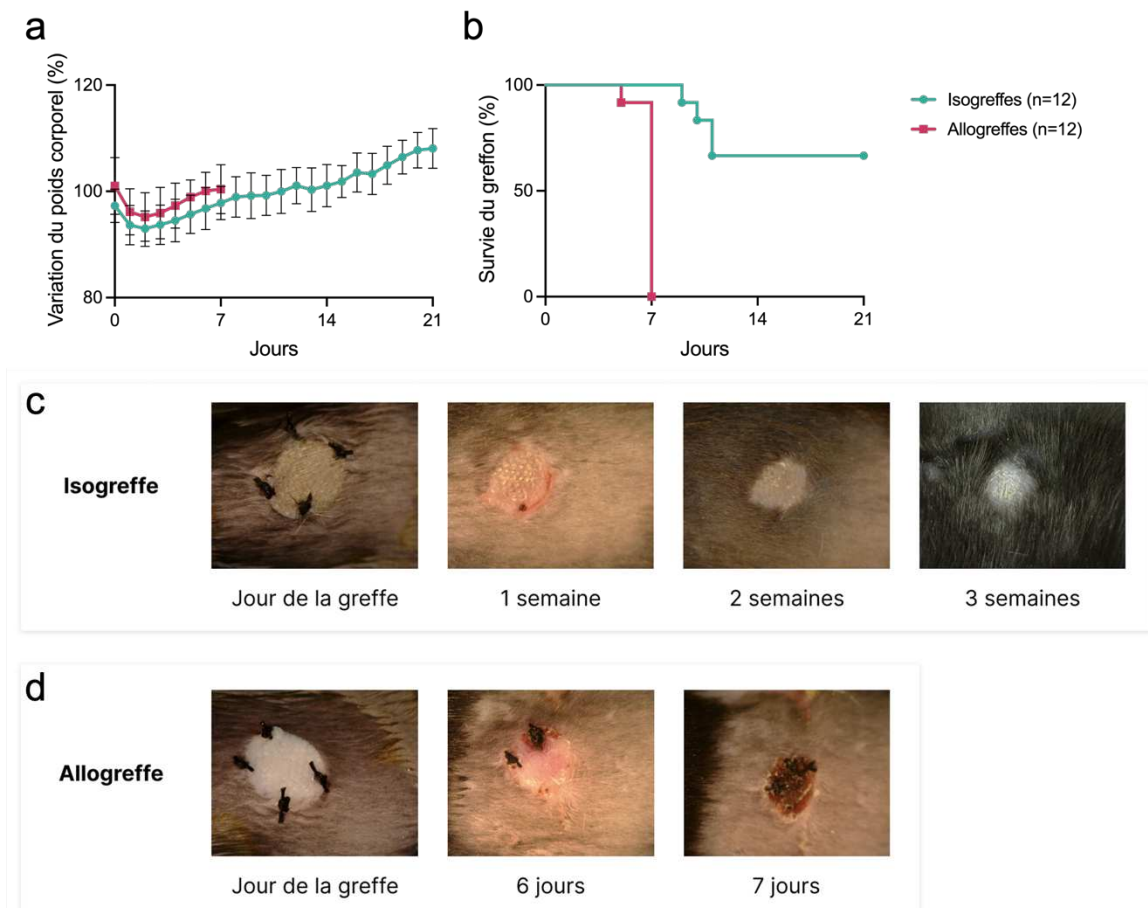


**Figure 33 – Protocole de greffe de peau**

La souris receveuse est anesthésiée sous isoflurane et la zone de greffe est rasée et désinfectée. Une biopsie circulaire est faite sur la peau de la souris receveuse afin d'y insérer le greffon préalablement prélevé. Des points de sutures sont ensuite réalisés entre le greffon et la peau de la souris receveuse. Un pansement est fait pour protéger la greffe à l'aide d'une gaze de vaseline, de film adhésif et de bande.

### III.2.1. Suivis des souris et de leur greffon

Le suivi des souris qui comprend la mesure du poids ainsi que la prise de photographies, a été réalisé sur 3 semaines pour les souris ayant reçu une isogreffe. Après leur greffe, les souris des 2 groupes perdent légèrement du poids mais retrouvent leur poids idéal 5-6 jours après la greffe (**Figure 34a**). Cette légère perte de poids est dû à l'anesthésie ainsi qu'à la chirurgie, afin de limiter cette perte de poids, de l'alimentation a été mise à disposition des souris à même la litière [146]. Les isogreffes semblent prendre au bout d'une semaine et peuvent rester jusqu'à 3 semaines après la greffe. Cependant, les allogreffes montrent des premiers signes de rejet dès 6 jours après la greffe et le greffon est complètement nécrosé après 7 jours (**Figure 34c et 34d**).

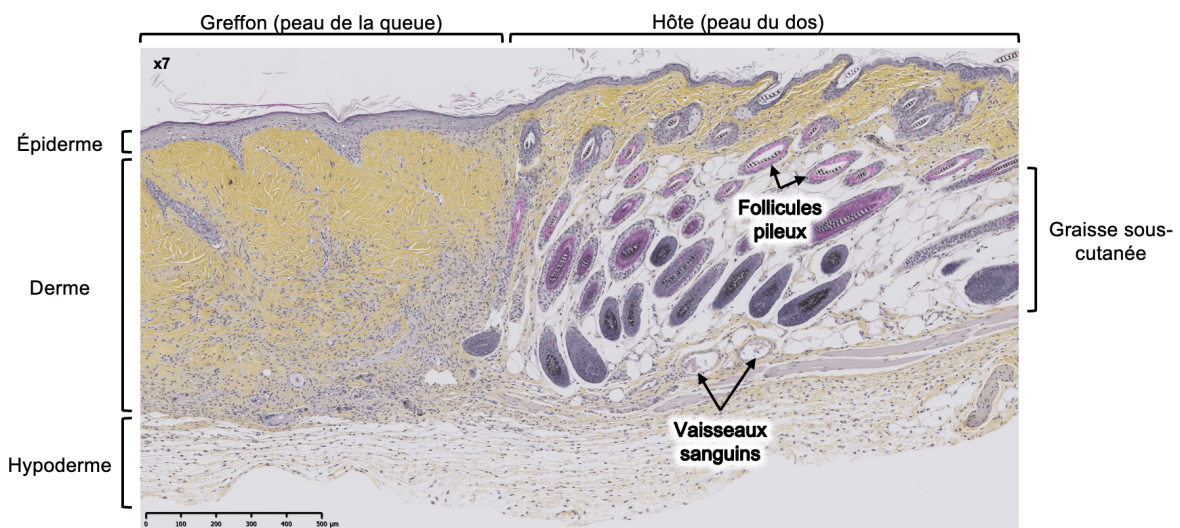


**Figure 34 – Paramètres de suivi des souris ainsi que leur greffons**

(a) Variation du poids corporel par rapport au jour 0 des souris ayant reçu une isogreffe ou une allogreffe. (b) Survie des greffons des souris greffées. (c) Photographies d'une isogreffe le jour de la greffe, au bout de 1, 2 et 3 semaines. (d) Photographies d'une allogreffe le jour de la greffe et 6 et 7 jours après. *Isogreffes (n=12), allogreffes (n=12)*.

### III.2.2. Création d'un score pour l'analyse des greffes

Afin d'avoir une analyse la plus robuste possible des greffes, un score histologie a été créé à partir de coupes transversales avec une coloration hématoxyline éosine et safran (HES) des greffons. Pour cela, après l'euthanasie des animaux, les greffons ont été récupérés avec de la peau saine et fixés en formol 4% fourni par le plateau d'histologie de la plateforme BISCEm. Les greffons ont ensuite été inclus en paraffine, coupés et une coloration HES a été effectuée. L'architecture de la peau saine ainsi que d'une isogreffe est présentée en **Figure 35**.



**Figure 35 – Architecture de la peau saine et d'une isogreffe.**

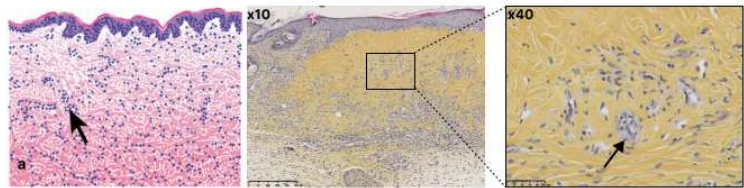
Le greffon (à gauche) et la peau saine de l'hôte (à droite) présentent un épiderme, un derme et un hypoderme. Au sein de la peau saine des follicules pileux, des vaisseaux sanguins et de la graisse sous-cutanée sont présents. L'échelle indique 500 µm, grossissement x7.

La mise au point du score a été effectuée grâce à une lecture en double aveugle des lames et basée sur la littérature [147,148]. Le score est principalement basé sur le stade de l'infiltration de cellules immunitaires au niveau du greffon, sur l'épaisseur de tissu vivant et sur le nombre de vaisseaux sanguins présents dans le greffon (**Figure 36**). Après lecture des lames en double aveugle, les souris ayant reçu une isogreffe ne dépassent pas un score histologique de 5 tandis que les souris ayant reçu une allogreffe ont un score supérieur à 10.

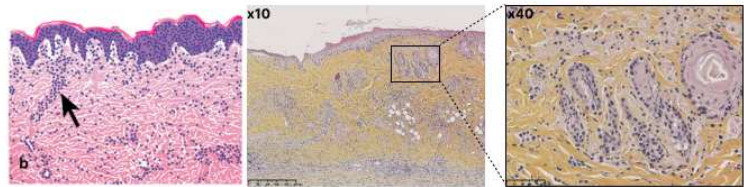
### Grade histologique

- Grade 0 → Score 1
- Grade 1 → Score 2
- Grade 2 → Score 3
- Grade 3 → Score 4
- Grade 4 → Score 5

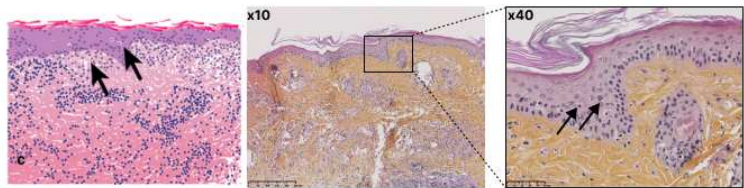
**Grade 1**  
Légère infiltration de cellules immunitaires au niveau du derme



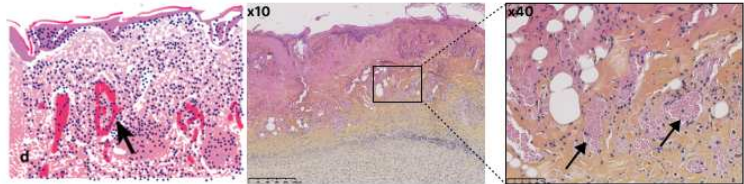
**Grade 2**  
Infiltration de cellules immunitaires diffuse, réaction à l'interface du derme et de l'épiderme



**Grade 3**  
Infiltration de cellules immunitaires dans l'épiderme, et apoptose des cellules épithéliales

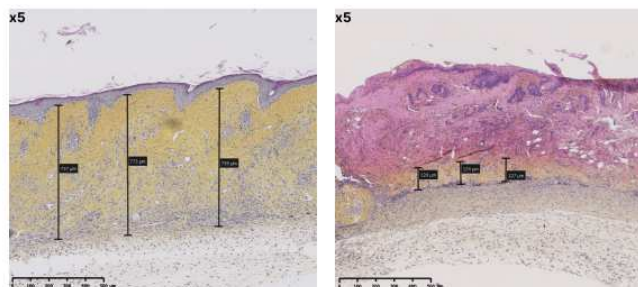


**Grade 4**  
Nécrose franche de l'épiderme et des autres structures



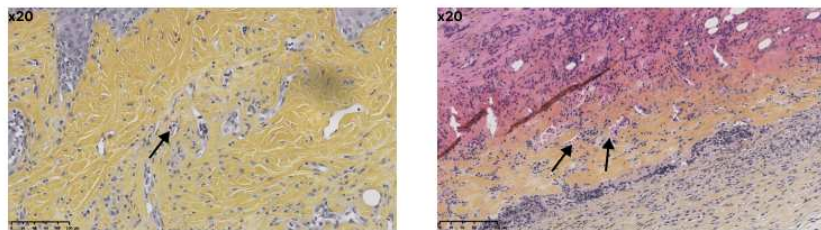
### Épaisseur (µm) du tissu vivant

- > 800 → Score 1
- 800 - 600 → Score 2
- 600 - 300 → Score 3
- 300 - 100 → Score 4
- < 100 → Score 5



### Nombre de vaisseaux sanguins dans la greffe

- 0 - 5 → Score 1
- 5 - 10 → Score 2
- 10 - 15 → Score 3
- + 15 → Score 4



**Figure 36 – Score histologique des greffes de peau**

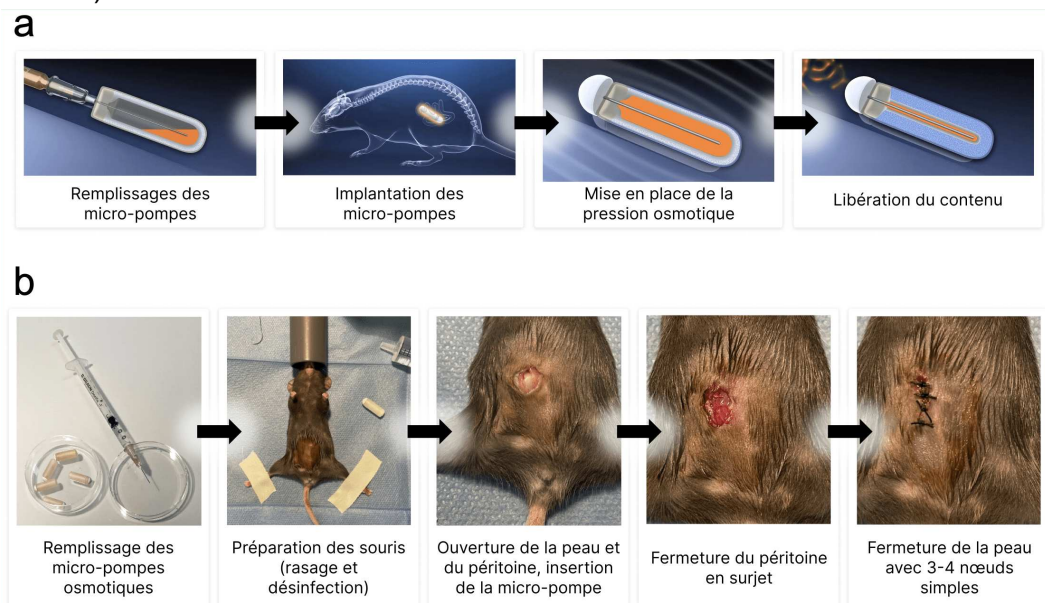
Le score histologique comprend l'analyse en double aveugle du grade de l'infiltration des cellules immunitaires, une moyenne de 3 mesures du tissu vivant du greffon et le nombre de vaisseaux sanguins dans le greffon.

### III.3. Mise au point de la supplémentation systémique en SCFA

Pour tester l'effet potentiel des SCFA au niveau systémique sur le devenir du greffon, nous avons testé différentes méthodes de supplémentation. Afin de réaliser la supplémentation systémique, nous avons choisi d'administrer le butyrate sur des cellules impliquées dans le rejet de greffe. Dans la littérature les modèles supplémentés en butyrate par différentes méthodes, ne montrent pas la concentration plasmatique en SCFA [149–151]. Nous avons donc pour cela supplémenté des souris en butyrate par 3 méthodes : micro-pompes osmotiques, eau de boisson et administration orale.

#### III.3.1. Implantation de micro-pompes osmotiques

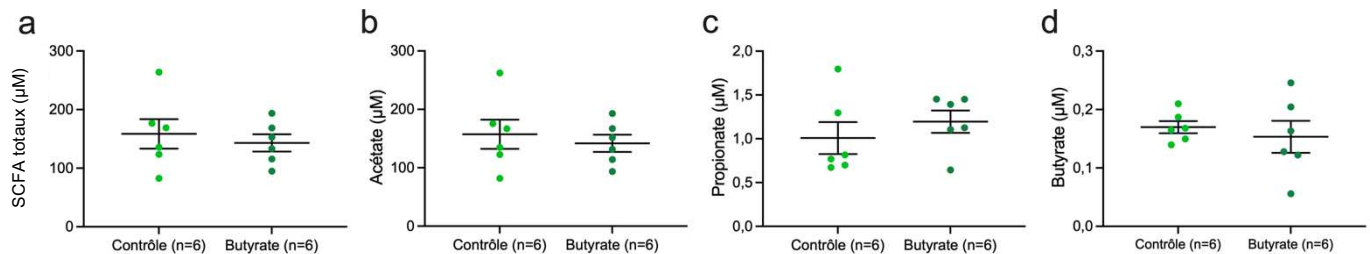
Afin d'être au plus proche du lieu de production des SCFA, nous avons décidé d'implanter les pompes osmotiques au niveau intra-péritonéal aux souris. Les micro-pompes 1004 de Alzet® ont été utilisées, elles délivrent le produit pour une durée de 4 semaines, leur mode de fonctionnement est décrit en **Figure 37a**. Pour l'implantation, les pompes ont été remplies d'une solution de butyrate de sodium à 340 g/L (30 mg/kg/j) ou de sérum physiologique (contrôles) de manière stérile avec une seringue de 27G. L'abdomen des souris, anesthésiées à l'isoflurane, a été rasé et désinfecté, puis la peau et le péritoine ont été ouverts. Les pompes ont, par la suite, été insérées dans le péritoine qui a été fermé ainsi que la peau (**Figure 37b**).



**Figure 37 – Fonctionnement et implantation des micro-pompes osmotiques**

(a) Les micro-pompes osmotiques sont remplies de manière stérile avec une seringue, puis sont implantées dans le péritoine des souris. Durant 1 semaine, l'eau environnante est absorbée et la pression osmotique est mise en place. Enfin, lorsque la pression osmotique est assez élevée, le contenu est libéré dans le péritoine. (b) Après avoir rempli les pompes osmotiques, les souris sont rasées et désinfectées. La peau et le péritoine sont ouverts pour insérer la pompe, puis sont refermés avec des points en surjet ou des nœuds simples.

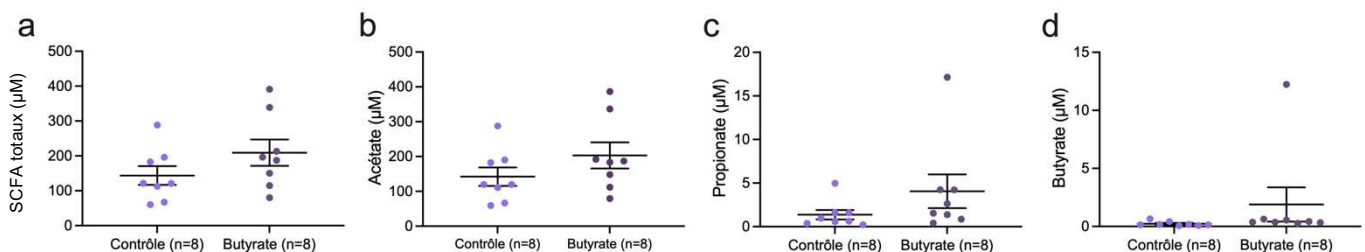
À la fin des 4 semaines de traitement, nous avons euthanasié les souris, le plasma a été récupéré et les SCFA (acétate, propionate et butyrate) ont été dosés par la même méthode de LC-MS/MS que précédemment. La concentration en SCFA totale reste identique entre les 2 groupes (*contrôle* :  $158,6 \pm 25,2 \mu\text{M}$  vs *butyrate* :  $143,2 \pm 14,7 \mu\text{M}$  avec  $p=0,61$ ) tout comme les concentrations en acétate, propionate et butyrate (**Figure 38**).



**Figure 38 – Concentrations en SCFA chez les souris implantées d'une micro-pompe osmotique**  
**(a)** Concentrations en SCFA totaux, **(b)** acétate, **(c)** propionate et **(d)** butyrate. Les résultats ont été analysés avec un test T de Student non apparié.

### III.3.2. Supplémentation dans l'eau de boisson

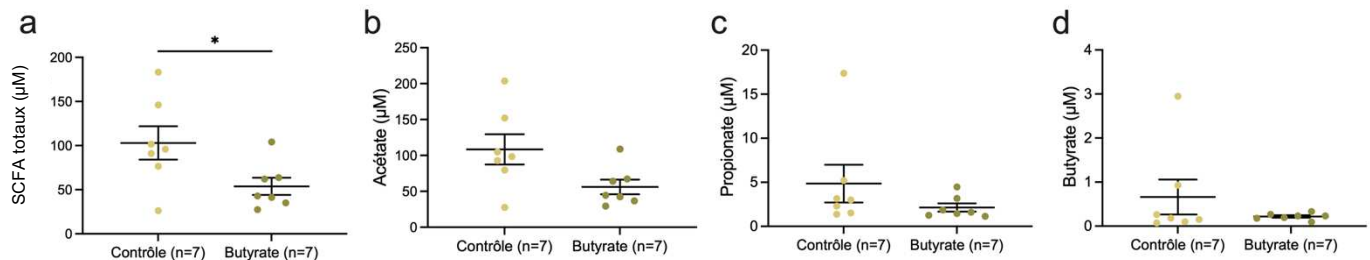
Pour la supplémentation dans l'eau de boisson, nous avons utilisé le même protocole que précédemment. Nous avons traité des souris par des concentrations croissantes en butyrate : 1 semaine à 1,5 mM, 1 semaine à 15 mM et 2 semaines à 150 mM de butyrate de sodium. La consommation d'eau a été mesurée sur la dernière semaine de traitement, les souris supplémentées en butyrate consomment la même quantité que les souris contrôles (**Annexe 3**). Par la suite, les souris ont été euthanasiées et leurs plasmas ont été récupérés pour doser les différents SCFA. Les souris supplémentées en butyrate présentent une légère augmentation systémique en SCFA totaux, qui n'est pas significative (*contrôle* :  $143,7 \pm 26,7 \mu\text{M}$  vs *butyrate* :  $209 \pm 37,7 \mu\text{M}$  avec  $p=0,18$ ) (**Figure 39**).



**Figure 39 – Concentrations en SCFA chez les souris supplémentées dans l'eau de boisson**  
**(a)** Concentrations en SCFA totaux, **(b)** acétate, **(c)** propionate et **(d)** butyrate. Les résultats ont été analysés avec un test T de Student non apparié.

### III.3.3. Administration orale de butyrate par gavage

Des souris ont été traitées durant 7 jours au butyrate (1 g/kg/j) par administration orale par gavage à l'aide d'une canule de 20G. Le plasma des souris a ensuite été récupéré et la concentration en SCFA a été dosée par LC-MS/MS. La concentration en SCFA totaux n'est pas retrouvée augmentée mais diminuée chez les souris traitées au butyrate (*contrôle* :  $103 \pm 19 \mu\text{M}$  vs *butyrate* :  $53,9 \pm 9,8 \mu\text{M}$  avec  $p=0,05$ ) (**Figure 40**).



**Figure 40 – Concentrations en SCFA chez les souris traitées en butyrate par administration orale**

(a) Concentrations en SCFA totaux, (b) acétate, (c) propionate et (d) butyrate. Les résultats ont été analysés avec un test T de Student non apparié. \* :  $p < 0,05$ .

### III.3.4. Conclusion sur la supplémentation

Afin de supplémenter des souris en SCFA et plus particulièrement en butyrate, nous avons testé 3 méthodes d'administration de butyrate. Pour les pompes osmotiques ainsi que pour l'administration orale, nous n'avons pas observé d'augmentation systémique en SCFA. Le butyrate dans les pompes osmotiques a dû être libéré dans le péritoine qui est un milieu avec un grand volume et riche en molécules, et n'a pu rejoindre la circulation systémique. De plus, la quantité de butyrate administrée était très faible et a donc pu être consommé par des cellules présentes dans le péritoine [152]. Le butyrate lors de l'administration orale a dû être absorbé dans les parties hautes du tube digestif et également consommé en partie par les cellules du tube digestif. En revanche, pour l'administration dans l'eau de boisson, nous observons une légère augmentation en SCFA totaux avec notamment une augmentation en acétate et propionate. Le butyrate a pu être transformé en acétate et propionate par plusieurs mécanismes notamment, les cellules du tube digestif, le foie, ou encore le microbiote digestif.

Le mode d'administration du butyrate que nous avons choisi est l'eau de boisson de par sa rapidité et sa facilité de mise en place ainsi que de par l'augmentation systémique en SCFA. Cependant, l'administration orale de tributyrine pourrait également augmenter la concentration systémique en SCFA puisque c'est une molécule qui fournit 3 molécules de butyrate une fois hydrolysée, qui a montré des effets bénéfiques dans plusieurs modèles murins [153–156].



### III.4. Conclusion et perspectives du chapitre 3

D'après la littérature, les SCFA pourraient avoir des effets immunomodulateurs et donc des effets bénéfiques sur la survie du greffon. En effet, une alimentation riche en fibres permet une augmentation de la survie du greffon dans un modèle murin de greffe rénale [157]. Après l'expérience de RLM, le butyrate, qui est le SCFA le plus actif pharmacologiquement, ne permet pas d'inhiber la prolifération de cellules immunitaires allogéniques. Des expériences supplémentaires pourraient être réalisées en combinant un immunosuppresseur au butyrate et en mesurant également les cytokines présentes dans le milieu. De plus, nous avons développé un modèle murin de greffe de peau afin d'étudier l'effet potentiel de la supplémentation en SCFA sur le devenir du greffon. Un traitement avec un immunosuppresseur qui entrainerait une acceptation du greffon, permettrait de valider ce modèle. Par la suite, plusieurs modes de supplémentation en butyrate ont été mis en place dans le but d'avoir une augmentation systémique en SCFA pour avoir un effet immunomodulateur sur les cellules circulantes et améliorer la survie du greffon. Cependant, le rejet dans notre modèle peut être trop précoce (7 jours), des expériences sont envisagées afin de passer la phase de rejet aigu à l'aide d'un immunosuppresseur pour ensuite évaluer le potentiel effet des SCFA.

## Chapitre IV. Synthèse et perspective en médecine de précision

---

Cette thèse a étudié l'impact des altérations du microbiote digestif en période post-transplantation sur la réponse aux immunosuppresseurs. Notre hypothèse est basée sur le fait qu'il existerait une altération de la barrière épithéliale intestinale induite par les immunosuppresseurs qui favoriserait une rupture de la tolérance du microbiote digestif à l'origine d'une inflammation systémique chronique qui perturberait l'homéostasie du greffon. Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'intégrité de la barrière intestinale lors d'un traitement immunosuppresseur. À partir d'échantillons de plasma issus d'une collection biologique, nous avons mis en évidence une augmentation (en comparaison à des volontaires sains) des lipopolysaccharides bactériens (LPS), qui sont des biomarqueurs de la perméabilité intestinale. Ces résultats nous ont permis de proposer un score de gravité de cette perméabilité qui combine le dosage du LPS avec le dosage plasmatique des acides gras à chaîne courte (SCFA) qui sont des métabolites majoritairement issus du microbiote. Ces travaux rapportent pour la première fois l'existence d'une perméabilité intestinale chez les patients transplantés. En perspectives, nous prévoyons d'effectuer ces analyses dans une cohorte de patients transplantés rénaux pour laquelle nous disposons d'échantillons à 1 mois, 1, 2, 3, 4 et 5 ans post-greffe. Nous pourrions ainsi analyser l'évolution systémiques de ces différents métabolites en fonction du temps et des caractéristiques des patients. De plus, nous prévoyons d'analyser des marqueurs de l'inflammation au niveau systémiques tels que la protéine C-réactive ou encore des cytokines pro-inflammatoires (IL6). Enfin, nous sommes actuellement en train de mettre en place un projet de recherche clinique qui permettra de récupérer des fèces issus de patients transplantés. Cela nous permettra d'analyser au plus près le microbiote intestinal et les différents métabolites produits, et ainsi d'étudier l'évolution de ce microbiote au cours de la transplantation.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé les altérations fonctionnelles du microbiote digestif pouvant expliquer cette perte d'intégrité de la barrière intestinale et évalué une stratégie thérapeutique. Nous avons pu montrer, à l'aide d'un modèle d'entéropathie liée à l'acide mycophénolique à différents stades de gravité (précoce et sévère), une altération fonctionnelle du microbiote caractérisée par la diminution de la production des SCFA et une altération des jonctions serrées entre les cellules épithéliales au niveau du côlon. Afin d'améliorer la robustesse de nos résultats avec ce modèle d'entéropathie, nous prévoyons d'augmenter le nombre d'animaux dans chaque groupe pour atteindre  $n=12$  par groupe (recommandations du test de puissance statistique). De plus, l'analyse des jonctions serrées se fera par une méthode plus sensible telle que la quantification par western-blot à l'aide d'échantillons de protéines récupérées au moment du sacrifice des animaux. Par la suite, nous

prévoyons d'analyser d'autres caractéristiques de l'entéropathie, telle que la présence de sang dans les selles, ou encore mesurer la sensibilité viscérale. Enfin, l'étude de médiateurs de l'inflammation sera envisagée afin de caractériser l'inflammation chronique chez les souris traitées au MMF (dosage ELISA de l'IL6 et de l'IL10, marquage des cellules inflammatoires neutrophiles et macrophages). La supplémentation en butyrate dans ce modèle d'entéropathie modéré corrige la perte d'expression des protéines de jonction. Afin d'aller plus loin dans l'analyse, nous allons compléter les effectifs dans chaque groupe expérimental. De plus, nous pourrions effectuer la supplémentation avec un mélange des 3 SCFA (acétate, propionate et butyrate) dans des proportions à définir, dans le modèle d'entéropathie modérée et sévère afin d'évaluer le potentiel bénéfique sur l'entéropathie. Cette supplémentation pourrait également être effectuée dans un modèle curatif, c'est-à-dire après induction de l'entéropathie. En se basant sur le fait qu'une alimentation riche en fibres permet la production de SCFA, nous pourrions donc étudier l'impact d'une supplémentation en aliments riches en fibres chez nos souris lors d'une entéropathie liée au MPA.

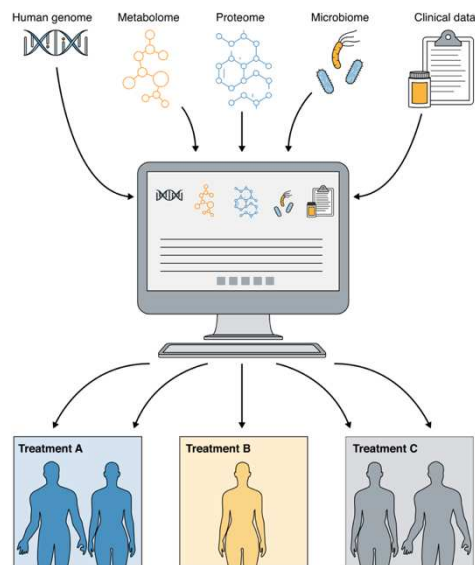
Au cours de ces travaux, nous avons également développé, validé et standardisé un modèle murin de greffe allogénique de peau chez la souris. Ce modèle servira à explorer l'impact d'une supplémentation en acide gras à chaîne courte sur le devenir du greffon.

La médecine de précision est une approche innovante pour la prévention et le traitement des maladies en tenant compte des différences entre les gènes, l'environnement et le mode de vie des individus. L'objectif de la médecine de précision est de cibler les bons traitements pour les bons patients au bon moment [158]. À cette définition issue de l'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux, l'état du microbiote digestif peut être ajouté. En effet, le microbiote digestif est un organe métabolique à part entière car il est capable d'effectuer une variété de réactions biochimiques afin d'inactiver, d'activer des médicaments ou encore de produire des métabolites toxiques [159]. La composition du microbiote digestif peut varier d'un individu à l'autre en fonction du type d'accouchement (voie basse ou césarienne), de l'environnement, de l'alimentation, de l'activité mais également de la prise de médicaments [160,161]. Tous ces événements peuvent mener à des modifications dans la composition du microbiote digestif, appelées dysbioses. Cette dysbiose est de plus en plus associée à des maladies chroniques telles que le diabète, des maladies cardiovasculaires ou encore des cancers [162].

Tous ces éléments démontrent l'importance de prendre en considération le microbiote digestif en médecine de précision et notamment en transplantation. En effet, un patient qui est amené à recevoir une greffe d'organe est généralement atteint d'une maladie en phase terminale depuis plusieurs années qui pourrait entraîner une dysbiose du microbiote digestif.

Lors du processus de transplantation, l'anesthésie, l'acte chirurgical, la prise d'immunosuppresseurs ainsi que d'agents anti-infectieux peuvent également aggraver la dysbiose [163]. La dysbiose peut aussi augmenter le risque pour les patients transplantés de développer des co-morbidités telles que le diabète ou encore de l'hypertension. Afin d'améliorer la prise en charge des patients transplantés, il serait intéressant d'analyser le microbiote digestif afin d'en évaluer son état (eubiose ou dysbiose). Cela permettrait, dans un sens, de limiter les désordres gastro-intestinaux observés chez 30% des patients transplantés traités à l'acide mycophénolique. De plus, le microbiote digestif est également impliqué dans la métabolisation du tacrolimus (inhibiteur de la voie de la calcineurine) en un métabolite 15-fois moins actif, entraînant ainsi un ajustement posologique des doses pouvant mener à une néphrotoxicité [164]. Enfin, il serait pertinent de regarder quelques années après la greffe l'état du microbiote digestif afin d'éviter le développement de co-morbidités telles que le diabète et l'hypertension artérielle dont les incidences augmentent en période post-transplantation.

Finalement, les prélèvements de routine associés aux visites de bien-être chez un médecin, combinés au génome humain et à d'autres données cliniques, peuvent révéler des signes précoces de maladie et améliorer le processus de décision concernant l'option de traitement (**Figure 41**) [165].



**Figure 41 – Stratégie de médecine de précision**

L'analyse du génome, du métabolome, du protéome, du microbiome et des données cliniques visent à identifier des options de traitement personnalisées pour les personnes présentant une maladie donnée.

*Figure issue de Petrosino, 2018 [165].*

## Références bibliographiques

---

1. Agence de la biomédecine 2021. Accessed June 23, 2023. <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-dorganes-donnees-generales-et-methodes>
2. Singh N, Samant H, Hawxby A, Samaniego MD. Biomarkers of rejection in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019;24(1):103-110. doi:10.1097/MOT.0000000000000606
3. Nasr M, Sigdel T, Sarwal M. Advances in diagnostics for transplant rejection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(10):1121-1132. doi:10.1080/14737159.2016.1239530
4. Jasiak NM, Park JM. Immunosuppression in Solid-Organ Transplantation: Essentials and Practical Tips. *Crit Care Nurs Q*. 2016;39(3):227-240. doi:10.1097/CNQ.000000000000117
5. Duncan MD, Wilkes DS. Transplant-related Immunosuppression. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(5):449-455. doi:10.1513/pats.200507-073JS
6. NIH Human Microbiome Project - Home. Accessed June 23, 2023. <https://hmpdacc.org/>
7. Zhang Z, Tang H, Chen P, Xie H, Tao Y. Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4(1):41. doi:10.1038/s41392-019-0074-5
8. Bik EM, Ugalde JA, Cousins J, Goddard AD, Richman J, Apte ZS. Microbial biotransformations in the human distal gut: Microbial biotransformations in the distal gut. *Br J Pharmacol*. 2018;175(24):4404-4414. doi:10.1111/bph.14085
9. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1):51. doi:10.1186/s13073-016-0307-y
10. Hollander D, Kaunitz JD. The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? *Dig Dis Sci*. 2020;65(5):1277-1287. doi:10.1007/s10620-019-05777-2
11. Agus A, Clément K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*. 2021;70(6):1174-1182. doi:10.1136/gutjnl-2020-323071
12. Liu P, Wang Y, Yang G, et al. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. *Pharmacol Res*. 2021;165:105420. doi:10.1016/j.phrs.2021.105420
13. Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *Proc Nutr Soc*. 2015;74(3):328-336. doi:10.1017/S0029665114001657
14. Fiorucci S, Biagioli M, Zampella A, Distrutti E. Bile Acids Activated Receptors Regulate Innate Immunity. *Front Immunol*. 2018;9. Accessed July 18, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01853>
15. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr Metab*. 2018;15(1):33. doi:10.1186/s12986-018-0271-1
16. Li X, Zhang B, Hu Y, Zhao Y. New Insights Into Gut-Bacteria-Derived Indole and Its Derivatives in Intestinal and Liver Diseases. *Front Pharmacol*. 2021;12. Accessed July 18, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.769501>
17. Fadhlouli K, Arnal ME, Martineau M, et al. Archaea, specific genetic traits, and development of improved bacterial live biotherapeutic products: another face of next-generation probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(11):4705-4716. doi:10.1007/s00253-020-10599-8
18. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In: *Advances in Immunology*. Vol 121. Elsevier; 2014:91-119. doi:10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9
19. Halimi JM, Persu A, Sarafidis PA, et al. Optimizing hypertension management in renal

- transplantation: a call to action. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2017;32(12):1959-1962. doi:10.1093/ndt/gfx283
20. Tedla F, Hayashi R, McFarlane SI, Salifu MO. Hypertension After Renal Transplant. *J Clin Hypertens.* 2007;9(7):538-545. doi:10.1111/j.1524-6175.2007.06588.x
  21. Masenga SK, Hamooya B, Hangoma J, et al. Recent advances in modulation of cardiovascular diseases by the gut microbiota. *J Hum Hypertens.* 2022;36(11):952-959. doi:10.1038/s41371-022-00698-6
  22. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 2015;65(6):1331-1340. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315
  23. Dan X, Mushi Z, Baili W, et al. Differential Analysis of Hypertension-Associated Intestinal Microbiota. *Int J Med Sci.* 2019;16(6):872-881. doi:10.7150/ijms.29322
  24. Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, et al. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. Proceedings of an international expert panel meeting. Barcelona, Spain, 19 February 2003. *Transplantation.* 2003;75(10 Suppl):SS3-24. doi:10.1097/01.TP.0000069952.49242.3E
  25. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490(7418):55-60. doi:10.1038/nature11450
  26. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature.* 2013;498(7452):99-103. doi:10.1038/nature12198
  27. Lewis CV, Taylor WR. Intestinal barrier dysfunction as a therapeutic target for cardiovascular disease. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2020;319(6):H1227-H1233. doi:10.1152/ajpheart.00612.2020
  28. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57(6):1470-1481. doi:10.2337/db07-1403
  29. Di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(23):12836. doi:10.3390/ijerph182312836
  30. Tulkens J, Vergauwen G, Van Deun J, et al. Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. *Gut.* 2020;69(1):191-193. doi:10.1136/gutjnl-2018-317726
  31. Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, et al. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2014;388(1-2):203-210. doi:10.1007/s11010-013-1911-4
  32. Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scand J Gastroenterol.* 2014;49(6):681-689. doi:10.3109/00365521.2014.898326
  33. Muniz L, Knosp C, Yeretssian G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front Immunol.* 2012;3. Accessed May 11, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00310>
  34. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:241-260. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163145
  35. Clevers H. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell.* 2013;154(2):274-284. doi:10.1016/j.cell.2013.07.004
  36. Miron N, Cristea V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(3):405-412. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04523.x
  37. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* 2005;7(7):997-1004. doi:10.1016/j.micinf.2005.04.003

38. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809. doi:10.1038/nri2653
39. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):1-9. doi:10.1038/s12276-018-0126-x
40. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):3-20. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038
41. Cerejido M, Contreras RG, Flores-Benítez D, et al. New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction. *Arch Med Res*. 2007;38(5):465-478. doi:10.1016/j.arcmed.2007.02.003
42. Birchenough GMH, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol*. 2015;8(4):712-719. doi:10.1038/mi.2015.32
43. Gustafsson JK, Johansson MEV. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19(12):785-803. doi:10.1038/s41575-022-00675-x
44. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine Cells: A Review of Their Role In Brain-Gut Communication. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. 2016;28(5):620-630. doi:10.1111/nmo.12754
45. Gribble FM, Reimann F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(4):226-237. doi:10.1038/s41574-019-0168-8
46. Schneider C, O'Leary CE, Locksley RM. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(9):584-593. doi:10.1038/s41577-019-0176-x
47. Hendel SK, Kellermann L, Hausmann A, Bindslev N, Jensen KB, Nielsen OH. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Front Immunol*. 2022;13:822867. doi:10.3389/fimmu.2022.822867
48. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(5):356-368. doi:10.1038/nrmicro2546
49. Lueschow SR, McElroy SJ. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Front Immunol*. 2020;11. Accessed May 14, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00587>
50. Kobayashi N, Takahashi D, Takano S, Kimura S, Hase K. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2019;10. Accessed May 14, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02345>
51. Ohno H. Intestinal M cells. *J Biochem (Tokyo)*. 2016;159(2):151-160. doi:10.1093/jb/mvv121
52. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65. doi:10.1038/nature08821
53. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008;320(5883):1647-1651. doi:10.1126/science.1155725
54. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355-1359. doi:10.1126/science.1124234
55. Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, et al. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J*. 2009;420(2):211-219. doi:10.1042/BJ20082222
56. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *J Nutr*. 2009;139(9):1619-1625. doi:10.3945/jn.109.104638
57. Shimada Y, Kinoshita M, Harada K, et al. Commensal Bacteria-Dependent Indole Production Enhances Epithelial Barrier Function in the Colon. *PLOS ONE*. 2013;8(11):e80604. doi:10.1371/journal.pone.0080604
58. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, et al. The mucus and mucins of the goblet cells

- and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* 2014;260(1):8-20. doi:10.1111/imr.12182
59. Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut.* 2020;69(12):2232-2243. doi:10.1136/gutjnl-2020-322260
  60. Hansson GC. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15(1):57-62. doi:10.1016/j.mib.2011.11.002
  61. Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280(5):G922-G929. doi:10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922
  62. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):15064-15069. doi:10.1073/pnas.0803124105
  63. Bergstrom KSB, Xia L. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology.* 2013;23(9):1026-1037. doi:10.1093/glycob/cwt045
  64. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2011;4(6):603-611. doi:10.1038/mi.2011.41
  65. Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol.* 2013;4. Accessed May 19, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00222>
  66. Corthésy B. Multi-Faceted Functions of Secretory IgA at Mucosal Surfaces. *Front Immunol.* 2013;4:185. doi:10.3389/fimmu.2013.00185
  67. Mestecky J, Russell MW, Elson CO. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut.* 1999;44(1):2-5. doi:10.1136/gut.44.1.2
  68. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res.* 2019;2019:7247238. doi:10.1155/2019/7247238
  69. Szigethy E, McLafferty L, Goyal A. Inflammatory Bowel Disease. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2010;19(2):301-318. doi:10.1016/j.chc.2010.01.007
  70. Scarpignato C, Hunt RH. Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Related Injury to the Gastrointestinal Tract: Clinical Picture, Pathogenesis, and Prevention. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010;39(3):433-464. doi:10.1016/j.gtc.2010.08.010
  71. Maiden L, Thjodleifsson B, Theodors A, Gonzalez J, Bjarnason I. A Quantitative Analysis of NSAID-Induced Small Bowel Pathology by Capsule Enteroscopy. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1172-1178. doi:10.1053/j.gastro.2005.03.020
  72. LANZA FL, MARATHI UK, ANAND BS, LICHTENBERGER LM. Clinical Trial: comparison of Ibuprofen-PC and ibuprofen on the GI safety and analgesic efficacy in osteoarthritic patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28(4):431-442. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03765.x
  73. Kamal A, Fain C, Park A, et al. Angiotensin II receptor blockers and gastrointestinal adverse events of resembling sprue-like enteropathy: a systematic review. *Gastroenterol Rep.* 2019;7(3):162-167. doi:10.1093/gastro/goz019
  74. Onteddu NK, Pulivarthi VSKK, Ginnavaram M, Kedika R. Olmesartan-induced enteropathy. *BMJ Case Rep.* 2018;2018:bcr2018224411. doi:10.1136/bcr-2018-224411
  75. Ebrahim VS, Martin J, Murthy S, Odstrcil E, Huang H, Polter D. Olmesartan-associated enteropathy. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2017;30(3):348-350.
  76. Bhatt AP, Pellock SJ, Biernat KA, et al. Targeted inhibition of gut bacterial  $\beta$ -glucuronidase activity enhances anticancer drug efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(13):7374-7381. doi:10.1073/pnas.1918095117
  77. Richardson G, Dobish R. Chemotherapy induced diarrhea. *J Oncol Pharm Pract.* 2007;13(4):181-198. doi:10.1177/1078155207077335



78. Kitchin JES, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K, Shupack JL. Rediscovering mycophenolic acid: A review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(3, Part 1):445-449. doi:10.1016/S0190-9622(18)30747-3
79. Calmet FH, Yarur AJ, Pukazhendhi G, Ahmad J, Bhamidimarri KR. Endoscopic and histological features of mycophenolate mofetil colitis in patients after solid organ transplantation. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol*. 2015;28(3):366-373.
80. Davies NM, Grinyó J, Heading R, Maes B, Meier-Kriesche HU, Oellerich M. Gastrointestinal side effects of mycophenolic acid in renal transplant patients: a reappraisal. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2007;22(9):2440-2448. doi:10.1093/ndt/gfm308
81. Filiopoulos V, Sakellariou S, Papaxoinis K, et al. Celiac-like Enteropathy Associated With Mycophenolate Sodium in Renal Transplant Recipients. *Transplant Direct*. 2018;4(8):e375. doi:10.1097/TXD.0000000000000812
82. Pustaszeri MP, Genta RM, Cryer BL. Drug-induced injury in the gastrointestinal tract: clinical and pathologic considerations. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007;4(8):442-453. doi:10.1038/ncpgasthep0896
83. Herlihy N, Feakins R. Gut inflammation induced by drugs: Can pathology help to differentiate from inflammatory bowel disease? *United Eur Gastroenterol J*. 2022;10(5):451-464. doi:10.1002/ueg2.12242
84. Srinivas TR, Kaplan B, Meier-Kriesche HU. Mycophenolate mofetil in solid-organ transplantation. *Expert Opin Pharmacother*. 2003;4(12):2325-2345. doi:10.1517/14656566.4.12.2325
85. Allison TL. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Nurs Clin North Am*. 2016;51(1):107-120. doi:10.1016/j.cnur.2015.10.008
86. Zizzo G, De Santis M, Ferraccioli GF. Mycophenolic acid in rheumatology: mechanisms of action and severe adverse events. *Reumatismo*. 2010;62(2):91-100. doi:10.4081/reumatismo.2010.91
87. Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-Selective Cytostatic and Immunosuppressive Effects of Mycophenolic Acid in Vitro: Role of Deoxyguanosine Nucleotide Depletion. *Scand J Immunol*. 1991;33(2):161-173. doi:10.1111/j.1365-3083.1991.tb03746.x
88. Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J*. 1969;113(3):515-524. doi:10.1042/bj1130515
89. Bergan S, Brunet M, Hesselink DA, et al. Personalized Therapy for Mycophenolate: Consensus Report by the International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. *Ther Drug Monit*. 2021;43(2):150. doi:10.1097/FTD.0000000000000871
90. Strathie Page SJ, Tait CP. Mycophenolic acid in dermatology a century after its discovery: A century of mycophenolic acid. *Australas J Dermatol*. 2015;56(1):77-83. doi:10.1111/ajd.12259
91. Liu V, Mackool B. Mycophenolate in dermatology. *J Dermatol Treat*. 2003;14(4):203-211. doi:10.1080/09546630310016826
92. Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, Le Meur Y, Marquet P. Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2005;33(1):139-146. doi:10.1124/dmd.104.001651
93. Picard N, Cresteil T, Prémaud A, Marquet P. Characterization of a Phase I Metabolite of Mycophenolic Acid Produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit*. 2004;26(6):600.
94. Genvigir FDV, Cerda A, Hirata TDC, Hirata MH, Hirata RDC. Mycophenolic acid pharmacogenomics in kidney transplantation. *J Transl Genet Genomics*. Published online 2020. doi:10.20517/jtgg.2020.37
95. Westley IS, Brogan LR, Morris RG, Evans AM, Sallustio BC. Role of Mrp2 in the Hepatic Disposition of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolites: Effect of Cyclosporine. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(2):261-266. doi:10.1124/dmd.105.006122

96. Ferreira PCL, Thiesen FV, Pereira AG, Zimmer AR, Fröhlich PE. A short overview on mycophenolic acid pharmacology and pharmacokinetics. *Clin Transplant*. 2020;34(8):e13997. doi:https://doi.org/10.1111/ctr.13997
97. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, et al. Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol*. 1999;126(5):1075-1082. doi:10.1038/sj.bjp.0702399
98. Kodawara T, Masuda S, Yano Y, Matsubara K, Nakamura T, Masada M. Inhibitory effect of ciprofloxacin on  $\beta$ -glucuronidase-mediated deconjugation of mycophenolic acid glucuronide: ciprofloxacin-MPAG interaction via  $\beta$ -glucuronidase. *Biopharm Drug Dispos*. 2014;35(5):275-283. doi:10.1002/bdd.1894
99. Prémaud A, Debord J, Rousseau A, et al. A Double Absorption-Phase Model Adequately Describes Mycophenolic Acid Plasma Profiles in De Novo Renal Transplant Recipients Given Oral Mycophenolate Mofetil. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(8):837-847. doi:10.2165/00003088-200544080-00005
100. Al-Absi AI, Cooke CR, Wall BM, Sylvestre P, Ismail MK, Mya M. Patterns of Injury in Mycophenolate Mofetil-Related Colitis. *Transplant Proc*. 2010;42(9):3591-3593. doi:10.1016/j.transproceed.2010.08.066
101. Behrend M. Adverse Gastrointestinal Effects of Mycophenolate Mofetil. *Drug Saf*. 2001;24(9):645-663. doi:10.2165/00002018-200124090-00002
102. Knoll GA, MacDonald I, Khan A, van Walraven C. Mycophenolate Mofetil Dose Reduction and the Risk of Acute Rejection after Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(9):2381. doi:10.1097/01.ASN.0000079616.71891.F5
103. Hardinger KL, Brennan DC, Lowell J, Schnitzler MA. Long-term outcome of gastrointestinal complications in renal transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Transpl Int*. 2004;17(10):609-616. doi:10.1111/j.1432-2277.2004.tb00394.x
104. Pelletier RP, Akin B, Henry ML, et al. The impact of mycophenolate mofetil dosing patterns on clinical outcome after renal transplantation: **Mycophenolate mofetil dosing and renal transplant outcome**. *Clin Transplant*. 2003;17(3):200-205. doi:10.1034/j.1399-0012.2003.00026.x
105. Arns W. Noninfectious Gastrointestinal (GI) Complications of Mycophenolic Acid Therapy: A Consequence of Local GI Toxicity? *Transplant Proc*. 2007;39(1):88-93. doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.189
106. Papadimitriou JC, Cangro CB, Lustberg A, et al. Histologic features of mycophenolate mofetil-related colitis: a graft-versus-host disease-like pattern. *Int J Surg Pathol*. 2003;11(4):295-302. doi:10.1177/106689690301100406
107. Selbst MK, Ahrens WA, Robert ME, Friedman A, Proctor DD, Jain D. Spectrum of histologic changes in colonic biopsies in patients treated with mycophenolate mofetil. *Mod Pathol*. 2009;22(6):737-743. doi:10.1038/modpathol.2009.44
108. Tett SE, Saint-Marcoux F, Staatz CE, et al. Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev Orlando Fla*. 2011;25(2):47-57. doi:10.1016/j.ttre.2010.06.001
109. Woillard JB, Saint-Marcoux F, Monchaud C, Youdarène R, Pouche L, Marquet P. Mycophenolic mofetil optimized pharmacokinetic modelling, and exposure-effect associations in adult heart transplant recipients. *Pharmacol Res*. 2015;99:308-315. doi:10.1016/j.phrs.2015.07.012
110. Barraclough KA, Lee KJ, Staatz CE. Pharmacogenetic influences on mycophenolate therapy. *Pharmacogenomics*. 2010;11(3):369-390. doi:10.2217/pgs.10.9
111. Bunnapradist S, Lentine KL, Burroughs TE, et al. Mycophenolate Mofetil Dose Reductions and Discontinuations after Gastrointestinal Complications Are Associated with Renal Transplant Graft

- Failure. *Transplantation*. 2006;82(1):102-107. doi:10.1097/01.tp.0000225760.09969.1f
112. Salvadori M, ERL 8301 Study Group. Long-term administration of enteric-coated mycophenolate sodium in kidney transplant patients. *Transplant Proc*. 2005;37(2):909-911. doi:10.1016/j.transproceed.2005.01.063
113. Pescovitz M, Conti D, Dunn J, et al. Intravenous mycophenolate mofetil: safety, tolerability, and pharmacokinetics. *Clin Transplant*. 2000;14(3):179-188. doi:10.1034/j.1399-0012.2000.140301.x
114. Taylor MR, Flannigan KL, Rahim H, et al. Vancomycin relieves mycophenolate mofetil–induced gastrointestinal toxicity by eliminating gut bacterial  $\beta$ -glucuronidase activity. *Sci Adv*. 2019;5(8). doi:10.1126/sciadv.aax2358
115. Qasim M, Rahman H, Ahmed R, Oellerich M, Asif A. Mycophenolic acid mediated disruption of the intestinal epithelial tight junctions. *Exp Cell Res*. 2014;322. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.021
116. Deng Y, Zhang Z, Yang H, et al. Mycophenolic Acid Induces the Intestinal Epithelial Barrier Damage through Mitochondrial ROS. Zhang Z, ed. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1-18. doi:10.1155/2022/4195699
117. Flannigan KL, Taylor MR, Pereira SK, et al. An intact microbiota is required for the gastrointestinal toxicity of the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2018;37(9):1047-1059. doi:10.1016/j.healun.2018.05.002
118. Stan TL, Soylu-Kucharz R, Burleigh S, et al. Increased intestinal permeability and gut dysbiosis in the R6/2 mouse model of Huntington’s disease. *Sci Rep*. 2020;10(1):18270. doi:10.1038/s41598-020-75229-9
119. Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(42). doi:10.1073/pnas.1415174111
120. Usuda H, Okamoto T, Wada K. Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7613. doi:10.3390/ijms22147613
121. Jourova L, Satka S, Frybortova V, et al. Butyrate Treatment of DSS-Induced Ulcerative Colitis Affects the Hepatic Drug Metabolism in Mice. *Front Pharmacol*. 2022;13:936013. doi:10.3389/fphar.2022.936013
122. Wang S, Deng W, Li F, Xiang L, Lv P, Chen Y. Treatment with butyrate alleviates dextran sulfate sodium and *Clostridium difficile*-induced colitis by preventing activity of Th17 cells via regulation of SIRT1/mTOR in mice. *J Nutr Biochem*. 2023;111:109155. doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109155
123. Klangjorhor J, Chaiyawat P, Teeyakasem P, et al. Mycophenolic acid is a drug with the potential to be repurposed for suppressing tumor growth and metastasis in osteosarcoma treatment. *Int J Cancer*. 2020;146(12):3397-3409. doi:10.1002/ijc.32735
124. Brown K, Abbott DW, Uwiera RRE, Inglis GD. Removal of the cecum affects intestinal fermentation, enteric bacterial community structure, and acute colitis in mice. *Gut Microbes*. 2018;9(3):218-235. doi:10.1080/19490976.2017.1408763
125. Jardou M, Provost Q, Brossier C, Pinault É, Sauvage FL, Lawson R. Alteration of the gut microbiome in mycophenolate-induced enteropathy: impacts on the profile of short-chain fatty acids in a mouse model. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2021;22(1):66. doi:10.1186/s40360-021-00536-4
126. Heischmann S, Dzieciatkowska M, Hansen K, Leibfritz D, Christians U. The Immunosuppressant Mycophenolic Acid Alters Nucleotide and Lipid Metabolism in an Intestinal Cell Model. *Sci Rep*. 2017;7:45088. doi:10.1038/srep45088
127. Takahashi H, Tokura M, Kawarasaki S, et al. Metabolomics reveals inosine 5'-monophosphate is increased during mice adipocyte browning. *J Biol Chem*. 2022;298(10):102456. doi:10.1016/j.jbc.2022.102456

128. Su H, Gunter JH, de Vries M, et al. Inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase reduces adipogenesis and diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;386(2):351-355. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.040
129. Aliyu M, Zohora F, Saboor-Yaraghi AA, Aliyu M, Zohora F, Saboor-Yaraghi AA. Spleen in innate and adaptive immunity regulation. *AIMS Allergy Immunol*. 2021;5(1):1-17. doi:10.3934/Allergy.2021001
130. Bullingham RES, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil: *Clin Pharmacokinet*. 1998;34(6):429-455. doi:10.2165/00003088-199834060-00002
131. Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol*. 1996;36(4):315-324. doi:10.1002/j.1552-4604.1996.tb04207.x
132. Jin BR, Chung KS, Cheon SY, et al. Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- $\kappa$ B and STAT3 activation. *Sci Rep*. 2017;7(1):46252. doi:10.1038/srep46252
133. Wang Z, Liang XY, Chang X, et al. MMI-0100 Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice through Targeting MK2 Pathway. *Molecules*. 2019;24(15):2832. doi:10.3390/molecules24152832
134. Rasmussen H, Kvarstein G, Johnsen H, et al. Gas supersaturation in the cecal wall of mice due to bacterial CO<sub>2</sub> production. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 1999;86(4):1311-1318. doi:10.1152/jap.1999.86.4.1311
135. Kong R, Liu T, Zhu X, et al. Old Drug New Use—Amoxapine and Its Metabolites as Potent Bacterial  $\beta$ -Glucuronidase Inhibitors for Alleviating Cancer Drug Toxicity. *Clin Cancer Res*. 2014;20(13):3521-3530. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0395
136. van der Hee B, Wells JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends Microbiol*. Published online March 2021:S0966842X21000354. doi:10.1016/j.tim.2021.02.001
137. Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, et al. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res*. 2009;69(7):2826-2832. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4466
138. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451-455. doi:10.1038/nature12726
139. Kespohl M, Vachharajani N, Luu M, et al. The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4<sup>+</sup> T Cells. *Front Immunol*. 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.01036
140. Verma MS, Fink MJ, Salmon GL, et al. A Common Mechanism Links Activities of Butyrate in the Colon. *ACS Chem Biol*. 2018;13(5):1291-1298. doi:10.1021/acscchembio.8b00073
141. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-450. doi:10.1038/nature12721
142. Garavaglia B, Vallino L, Ferraresi A, et al. Butyrate Inhibits Colorectal Cancer Cell Proliferation through Autophagy Degradation of  $\beta$ -Catenin Regardless of APC and  $\beta$ -Catenin Mutational Status. *Biomedicines*. 2022;10(5):1131. doi:10.3390/biomedicines10051131
143. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- $\beta$ -Mediated Induction of Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cells. *J Immunol*. 2007;178(7):4022-4026. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4022
144. Okubo Y, Mera T, Wang L, Faustman DL. Homogeneous Expansion of Human T-Regulatory Cells Via Tumor Necrosis Factor Receptor 2. *Sci Rep*. 2013;3(1):3153. doi:10.1038/srep03153

145. Pakyari M, Farokhi A, Khosravi-Maharlooei M, Kilani RT, Ghahary A, Brown E. A new method for skin grafting in murine model. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2016;24(4):695-704. doi:10.1111/wrr.12445
146. Molina-Cimadevila MJ, Segura S, Merino C, Ruiz-Reig N, Andrés B, de Madaria E. Oral self-administration of buprenorphine in the diet for analgesia in mice. *Lab Anim.* 2014;48(3):216-224. doi:10.1177/0023677214532454
147. Hautz T, Zelger BG, Weißenbacher A, et al. Standardizing skin biopsy sampling to assess rejection in vascularized composite allotransplantation. *Clin Transplant.* 2013;27(2):E81-E90. doi:10.1111/ctr.12086
148. Leonard DA, Amin KR, Giele H, Fildes JE, Wong JKF. Skin Immunology and Rejection in VCA and Organ Transplantation. *Curr Transplant Rep.* 2020;7(4):251-259. doi:10.1007/s40472-020-00310-1
149. Okamoto T, Morino K, Ugi S, et al. Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2019;316(5):E956-E966. doi:10.1152/ajpendo.00510.2018
150. Park HJ, Jeong OY, Chun SH, et al. Butyrate Improves Skin/Lung Fibrosis and Intestinal Dysbiosis in Bleomycin-Induced Mouse Models. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2765. doi:10.3390/ijms22052765
151. Fang W, Xue H, Chen X, Chen K, Ling W. Supplementation with Sodium Butyrate Modulates the Composition of the Gut Microbiota and Ameliorates High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *J Nutr.* 2019;149(5):747-754. doi:10.1093/jn/nxy324
152. Ray A, Dittel BN. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *J Vis Exp JoVE.* 2010;(35):1488. doi:10.3791/1488
153. Cresci GA, Bush K, Nagy LE. Tributyrin Supplementation Protects Mice from Acute Ethanol-Induced Gut Injury. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014;38(6):1489-1501. doi:10.1111/acer.12428
154. Glueck B, Han Y, Cresci G a. M. Tributyrin Supplementation Protects Immune Responses and Vasculature and Reduces Oxidative Stress in the Proximal Colon of Mice Exposed to Chronic-Binge Ethanol Feeding. *J Immunol Res.* 2018;2018:e9671919. doi:10.1155/2018/9671919
155. Fachi JL, Felipe J de S, Pral LP, et al. Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell Rep.* 2019;27(3):750-761.e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.054
156. Jung DH, Yong JH, Hwang W, Yoon MY, Yoon SS. An efficient system for intestinal on-site butyrate production using novel microbiome-derived esterases. *J Biol Eng.* 2021;15(1):9. doi:10.1186/s13036-021-00259-4
157. Wu H, Singer J, Kwan TK, et al. Gut Microbial Metabolites Induce Donor-Specific Tolerance of Kidney Allografts through Induction of T Regulatory Cells by Short-Chain Fatty Acids. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(7):1445-1461. doi:10.1681/ASN.2019080852
158. Commissioner O of the. U.S. Food and Drug Administration. FDA. <https://www.fda.gov/home>
159. Tuteja S, Ferguson JF. The Gut Microbiome and Response to Cardiovascular Drugs. *Circ Genomic Precis Med.* 2019;12(9):421-429. doi:10.1161/CIRCGEN.119.002314
160. Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, et al. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients.* 2019;11(10):2393. doi:10.3390/nu11102393
161. Kapourchali FR, Cresci GAM. Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* 2020;35(3):386-405. doi:10.1002/ncp.10490
162. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(5):1137-1150.

doi:10.1097/MIB.0000000000000750

163. Faucher Q, Jardou M, Brossier C, Picard N, Marquet P, Lawson R. Is Intestinal Dysbiosis-Associated With Immunosuppressive Therapy a Key Factor in the Pathophysiology of Post-Transplant Diabetes Mellitus? *Front Endocrinol.* 2022;13. doi:10.3389/fendo.2022.898878

164. Gabarre P, Loens C, Tamzali Y, Barrou B, Jaisser F, Tourret J. Immunosuppressive therapy after solid organ transplantation and the gut microbiota: Bidirectional interactions with clinical consequences. *Am J Transplant.* 2022;22(4):1014-1030. doi:10.1111/ajt.16836

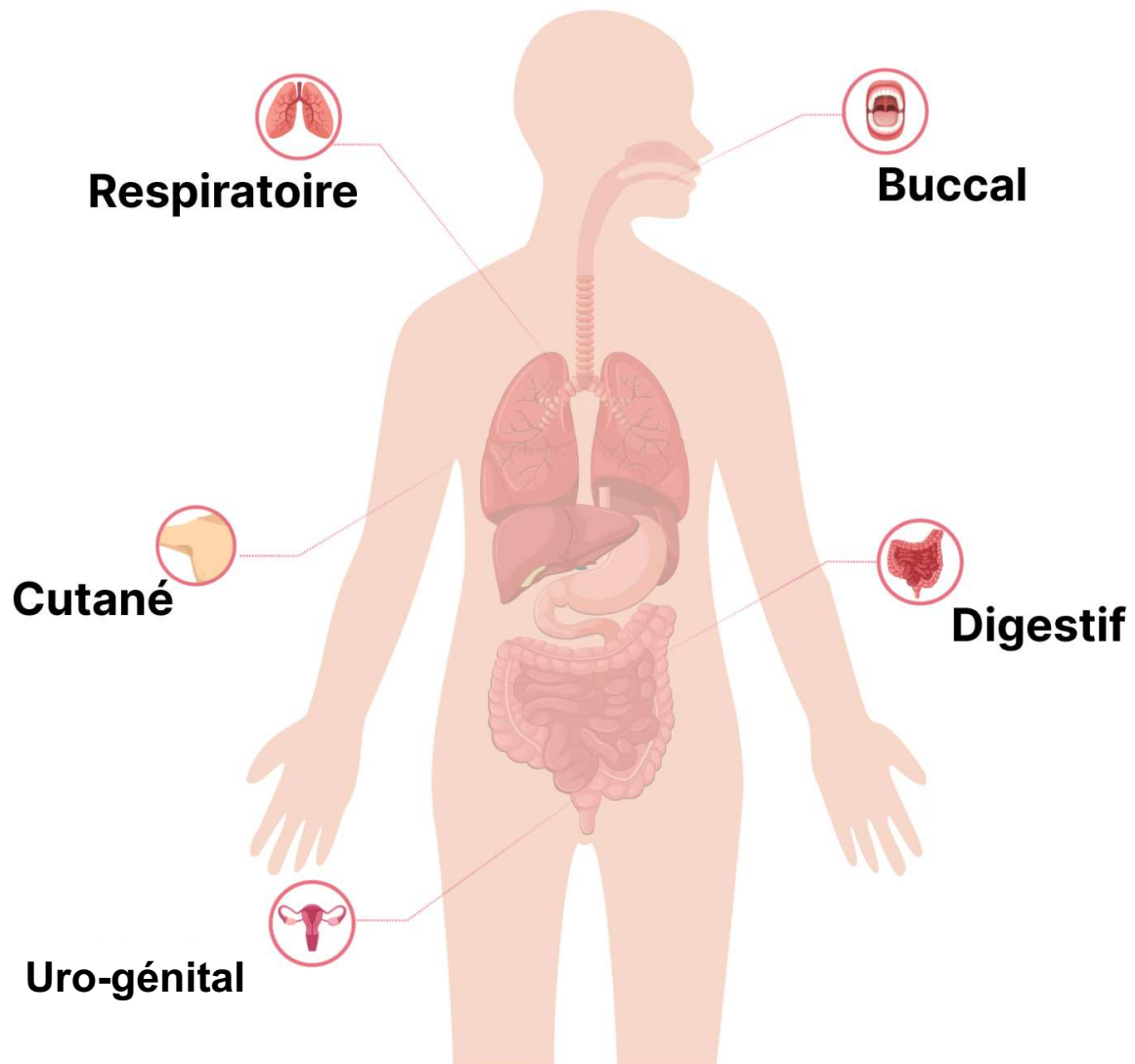
165. Petrosino JF. The microbiome in precision medicine: the way forward. *Genome Med.* 2018;10(1):12. doi:10.1186/s13073-018-0525-6

## Annexes

---

<b>Annexe 1 – Différents microbiotes du corps humain</b> .....	136
<b>Annexe 2 – Contenu supplémentaire du travail expérimental 2</b> .....	137
<b>Annexe 3 – Mesure du volume de boisson consommée par les souris supplémentées en butyrate</b> .....	138
<b>Annexe 4 – Tableau des concentrations en MPA et MPAG des points de gamme pour le dosage dans le plasma</b> .....	139
<b>Annexe 5 - Tableau des concentrations en MPA et MPAG des points de gamme pour le dosage dans les fèces</b> .....	140
<b>Annexe 6 – Tableau des concentrations en AGCC (acétate, propionate et butyrate) des points de gamme pour le dosage dans le plasma</b> .....	141
<b>Annexe 7 – Tableau des concentrations en AGCC (acétate, propionate et butyrate) des points de gamme pour le dosage dans les fèces</b> .....	142
<b>Annexe 8 – Évaluation de la prolifération d’une culture de cellules épithéliales intestinales après traitement au MPA</b> .....	143
<b>Annexe 9 – Résumé et résultats de l’effet de l’amoxapine sur l’entéropathie induite par le MPA</b> .....	144
<b>Annexe 10 – Mini revue sur le rôle du microbiote intestinal dans le diabète <i>de novo</i> post-transplantation</b> .....	147
<b>Annexe 11 – Article d’hypothèse sur le rôle potentiel des AGCC lors de l’infection à SARS-CoV-2</b> .....	156

## Annexe 1 – Différents microbiotes du corps humain



Un grand nombre de micro-organismes, tels que des bactéries, des champignons et des virus, coexistent dans divers endroits du corps humain (intestin, peau, poumon, cavité buccale et uro-génital). En outre, le microbiote humain apporte plus de 150 fois plus d'informations génétiques que l'ensemble du génome humain. Bien que les termes "microbiote" et "microbiome" soient souvent interchangeables, il existe certaines différences entre ces deux termes. Le microbiote décrit les micro-organismes vivants présents dans un environnement défini. Le microbiome désigne les génomes de tous les micro-organismes présents dans l'environnement. La composition du microbiote varie selon les muqueuses et le microbiote digestif est considéré comme le plus important.

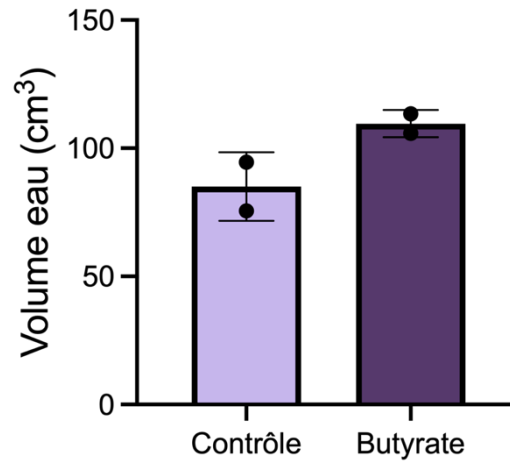


## Supplementary material

**Table S1.** Tandem MS parameters for short-chain fatty acids and internal standards. Quantification transition is indicated in bold.

		Compound parameters							
SCFA-3-NPH derivatives	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (ms)	Q1 prebias (V)	Collision energy (V)	Q3 prebias (V)			
Acetic acid	<b>194.4</b>	<b>137.05</b>	<b>25</b>	<b>23</b>	<b>22</b>	<b>26</b>			
	194.4	152.1	25	22	16	29			
	194.4	107.0	25	20	26	10			
	194.4	46.0	25	10	18	10			
D4-acetate	<b>197.5</b>	<b>137.1</b>	<b>25</b>	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>29</b>			
	197.5	153.1	25	10	17	14			
	197.5	107.1	25	14	24	13			
	197.5	150.05	25	10	16	13			
Propionic acid	<b>208.4</b>	<b>137.05</b>	<b>25</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>30</b>			
	208.4	165.15	25	24	15	30			
	208.4	152.1	25	10	17	14			
	208.4	46	25	10	34	10			
D2-propionate	<b>210.3</b>	<b>137.15</b>	<b>25</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>28</b>			
	210.3	107	25	23	26	29			
	210.3	167.15	25	24	15	25			
	210.3	153.1	25	23	15	14			
Butyric acid	<b>222.3</b>	<b>137.05</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>22</b>	<b>28</b>			
	222.3	152.15	25	27	17	30			
	222.3	107.1	25	24	26	16			
	222.3	179.25	25	24	15	11			
D7-butyrate	<b>229.3</b>	<b>137.05</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>22</b>	<b>29</b>			
	229.3	107.05	25	26	27	22			
	229.3	153.15	25	25	18	27			
	229.3	186.2	25	12	15	16			
Source parameters									
Nebulizer gas flow rate (L/min)	Drying gas flow rate (L/min)	Heating gas (L/min)	Interface temperature (°C)	Heat Block temperature (°C)	DL temperature (°C)	CID gas pressure (kPa)			
3	10	10	300	400	250	350			

**Annexe 3 – Mesure du volume de boisson consommée par les souris supplémentées en butyrate**



*Mesure du volume d'eau bu par les souris sur la dernière semaine de traitement. Les souris étaient séparées en 2 cages de 4.*

**Annexe 4 – Tableau des concentrations en MPA et MPAG des points de gamme pour le dosage dans le plasma**

<b>Points de gamme</b>	<b>MPA</b>	<b>MPAG</b>
<b>1</b>	0,2 mg/L	0,05 mg/L
<b>2</b>	0,5 mg/L	0,125 mg/L
<b>3</b>	1 mg/L	0,25 mg/L
<b>4</b>	2 mg/L	0,5 mg/L
<b>5</b>	10 mg/L	2,5 mg/L
<b>6</b>	20 mg/L	5 mg/L

**Annexe 5 - Tableau des concentrations en MPA et MPAG des points de gamme pour le dosage dans les fèces**

<b>Points de gamme</b>	<b>MPA</b>	<b>MPAG</b>
<b>1</b>	0,2 mg/L	0,01 mg/L
<b>2</b>	0,5 mg/L	0,025 mg/L
<b>3</b>	1 mg/L	0,05 mg/L
<b>4</b>	2 mg/L	0,1 mg/L
<b>5</b>	10 mg/L	0,5 mg/L
<b>6</b>	20 mg/L	1 mg/L

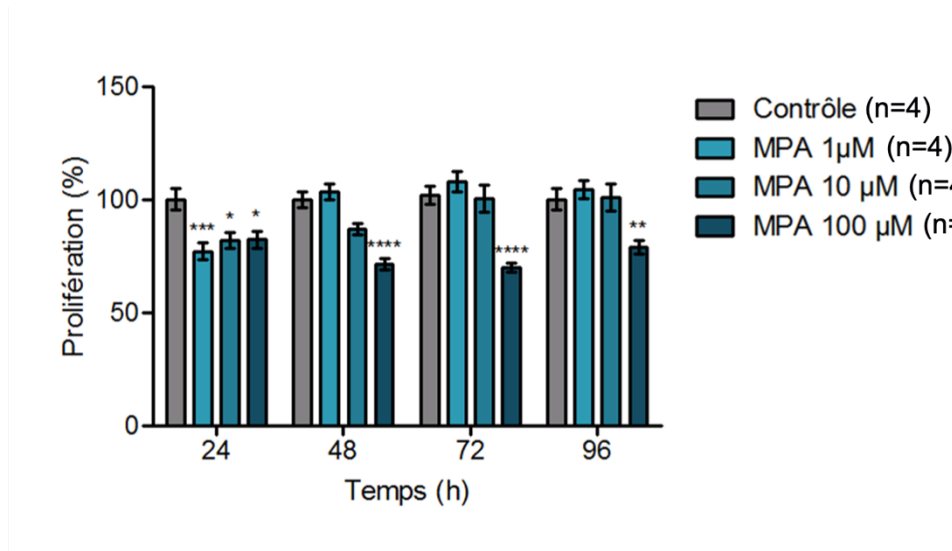
**Annexe 6 – Tableau des concentrations en AGCC (acétate, propionate et butyrate) des points de gamme pour le dosage dans le plasma**

<b>Points de gamme</b>	<b>Acétate</b>	<b>Propionate</b>	<b>Butyrate</b>
<b>1</b>	5 µM	0,25 µM	0,1 µM
<b>2</b>	10 µM	0,5 µM	0,2 µM
<b>3</b>	40 µM	2 µM	0,8 µM
<b>4</b>	100 µM	5 µM	2 µM
<b>5</b>	250 µM	12,5 µM	5 µM
<b>6</b>	500 µM	25 µM	10 µM
<b>7</b>	1000 µM	50 µM	20 µM

**Annexe 7 – Tableau des concentrations en AGCC (acétate, propionate et butyrate) des points de gamme pour le dosage dans les fèces**

<b>Points de gamme</b>	<b>Acétate</b>	<b>Propionate</b>	<b>Butyrate</b>
<b>1</b>	10 µM	1 µM	200 µM
<b>2</b>	50 µM	5 µM	80 µM
<b>3</b>	100 µM	10 µM	16 µM
<b>4</b>	250 µM	25 µM	10 µM
<b>5</b>	400 µM	40 µM	4 µM
<b>6</b>	2 mM	200 µM	2 µM
<b>7</b>	5 mM	500 µM	0,4 µM

## Annexe 8 – Évaluation de la prolifération d’une culture de cellules épithéliales intestinales après traitement au MPA



Culture de cellules épithéliales intestinales (HT29) avec des concentrations croissantes de MPA (1, 10 et 100  $\mu\text{M}$ ) durant 24, 48, 72 et 96h. A chaque temps, un test colorimétrique d'analyse de la prolifération (MTS) a été réalisé en n=6 répliques techniques et n=4 répliques biologiques. *Les résultats ont été analysés avec un test ANOVA à 2 facteurs avec un post-test de Bonferroni.*

## EACPT Virtual Meeting 2021

Focus on Progress in Clinical Pharmacology

28-29 June 2021

<https://doi.org/10.1007/s00228-021-03164-3>

530

Eur J Clin Pharmacol (2021) 77 (Suppl 1):S1–S42

**Methods:** We performed a netnographic study by applying ethnographic methods to publicly available online content of web forums. We identified the memantine users' experiences posted on English and French-written web forums. We anonymously extracted all related discussion threads, posted anytime until July 2019, except those reporting experiences in Alzheimer's disease. A qualitative thematic content analysis was performed.

**Results:** We included 128 discussion threads from 5 websites: reddit.com (n=104); drugs-forum.com (n=9); erowid.org (n=8); bluelight.org (n=5) and psychoactif.org (n=2). We classified the related content in six themes: i) Products, sourcing and decision making (n=31); ii) Motivation for use (n=95); iii) Route of administration and doses (n=70); iv) Perceived effects and outcomes (n=109); v) Comparison or combination to other drugs (n=30); vi) Tolerance and abuse potential (n=23). When details were available, users were mostly males, aged between 18 and 27 and experimented recreational drug users. They reported using memantine for therapeutic purposes or in search for recreational, dissociative effects; and described a limited abuse/addiction liability due to pharmacological features perceived as detrimental for misuse and to the easy access of more attractive substances.

**Discussion:** Our analysis highlighted two types of uses, either motivated by recreational or therapeutic purposes and characterized by broadly different practices. Although of lower magnitude than those observed with other dissociative drugs, memantine misuse and diversion practices exist and are shared online by users. The use of an innovative online ethnographic method is useful to describe previously unknown drug consumption practices from the users' perspective.

Poster Session 4b - Toxicology/health technology/drug access

22

Prescribing of oral anticoagulants for patients with atrial fibrillation of age  $\geq 65$  years in Estonia – national quality indicator

Dr Toomas Marandi<sup>1,2</sup>, Mrs Pille-Riin Vare<sup>3</sup>, Dr Tiia Ainla<sup>1,2</sup>, Dr Katrin Martinson<sup>4</sup>, Mr Erki Laidmäe<sup>5</sup>, Associate professor Priit Kampus<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>North Estonia Medical Centre, Tallinn, Estonia

<sup>2</sup>Department of Cardiology, Institute of Clinical Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia

<sup>3</sup>Estonian Health Insurance Fund, Tartu, Estonia

<sup>4</sup>Linnamõisa Family Medicine Center, Tallinn, Estonia

<sup>5</sup>Estonian Health Insurance Fund, Tallinn, Estonia

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia in adults associated with substantial morbidity (i.e. increase of stroke, heart failure, impaired quality of life etc) and mortality. Routine use of oral anticoagulants (OACs) is recommended for patients with AF with CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc score values  $\geq 2$  (men) and  $\geq 3$  (women) for stroke prevention. According to data from different registries 70-80 % of patients with age  $> 65$  years have high thromboembolic risk, thus recommendation to use OACs is almost universal. Proportion of AF patients with high thromboembolic risk who are prescribed oral anticoagulation is a national quality indicator in Estonia.

**Objective:** To study prescribing of OACs in daily doses for stroke prevention for patients with age  $\geq 65$  years with AF (ICD-10 diagnosis I48).

**Methods:** List of patients of age  $\geq 65$  years with documented diagnoses I48 (ICD-10th version) from year 2018 and alive on 01.01.2019 was obtained from Health Insurance Fund's database. From Estonian Medical Prescription Center data about prescribed daily doses for the period 01.01-31.12.2019 or until death was obtained. For lifeday coverage analysis daily doses of OACs for stroke prevention were used: warfarin (3 mg or 5 mg, arbitrarily, OD)

rivaroxaban (15 mg or 20 mg OD), apixaban 2.5 mg or 5 mg BD), dabigatran (110 mg or 150 mg BD) and edoxaban (30 mg or 60 mg OD). We excluded patients treated for other concomitant diseases by low molecular weight heparins (enoxaparin, dalteparin, nadroparin, bemiparin); prescriptions with lower (inappropriate) doses of rivaroxaban and dabigatran if not used concomitantly with clopidogrel or ticagrelor were classified as missing-prescriptions.

**Results:** There were 33951 patients (13466 men and 20485 women) with age  $\geq 65$  years diagnosed AF during the year 2018 and alive in 01.01.2019. 26992 (79.5%) of them had at least one prescription of OACs for year 2019. All cause mortality was 8.9% (n=3027) during followup.

**Conclusion:** Proportion of lifedays of patients with AF covered by prescription of oral anticoagulants in recommended doses for stroke prevention needs further improvement. In addition, dispensing of prescriptions at pharmacies needs further studies before implementing next targeted interventions on national level.

This work was supported by Estonian Research Council [PRG435]

Lifedays covered with daily doses for stroke prevention (%)	Men (n, %)	Women (n, %)	Total (n, %)
$\geq 100$	4263, 31.7	6992, 34.1	11255, 33.2
90-99	2338, 17.4	3659, 17.9	5997, 17.7
80-89	1111, 8.3	1619, 7.9	2730, 8.0
60-79	1237, 9.2	1782, 8.7	3019, 8.9
40-59	890, 6.6	1134, 5.5	2024, 6.0
20-39	461, 3.4	628, 3.1	1089, 3.2
1-19	355, 2.6	523, 2.6	878, 2.6
0	2811, 20.9	4148, 20.2	6959, 20.5

31

**Amoxapine alleviates gastrointestinal damages induced by mycophenolic acid in a mouse model**

Ms Manon Jardou<sup>1</sup>, Ms Djouher Firoud<sup>1</sup>, Dr Claire-Cécile Barrot<sup>1</sup>, Ms Hélène Amion<sup>1</sup>, Ms Emilie Pinault<sup>1</sup>, Mr François-Ludovic Sauvage<sup>1</sup>, Dr James Javellaud<sup>1</sup>, Pr Pierre Marquet<sup>1,2</sup>, Dr Roland Lawson<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, IPPRIT, CHU Limoges (U1248), Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS), Limoges, France

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Limoges, Limoges, France

<sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, University of Limoges, Limoges, France

**Introduction:** Mycophenolic acid (MPA), which is one of the most widely used immunosuppressants, is often associated with gastrointestinal adverse effects. More than 30% of patients suffer from nausea, vomiting, abdominal pain, diarrhea, erosions or ulcerations. The underlying mechanisms are still poorly understood. Recent investigations have pointed to the possible contribution of intestinal dysbiosis. MPA treatment has been shown to favour the expansion of beta-glucuronidase ( $\beta$ -G) expressing bacteria. This bacterial enzyme is involved in the intestinal back-transformation of mycophenolic acid glucuronide (MPAG), an inactive liver metabolite excreted in the bile, into MPA. Therefore, we suggest that local exposure to high concentrations of MPA could trigger gastrointestinal damages.

**Objectives:** This study investigated the effect of amoxapine, a well-known antidepressant but also inhibitor of bacterial  $\beta$ -G, in reducing intestinal exposure to MPA and preventing gastrointestinal damages induced by MPA in a mouse model.

**Methods:** Seven week old C57BL/6J (SOPF) mice were randomly assigned in 4 groups of 8 mice per group: (G1) vehicle, (G2) mycophenolate mofetil (MMF), a prodrug of MPA (900 mg/kg/day), (G3) amoxapine (5mg/kg/day) and (G4) MMF + amoxapine. All the treatments were given

Springer



once daily by oral gavage for 7 days. Fecal samples were collected on day 0, day 4 and day 8 to access MPA and MPAG concentrations (LC-MS/MS). After the sacrifice (day 8), the proximal colon was harvested for histological analysis (hematoxylin-eosin-saffron staining).

**Results:** Concomitant treatment with amoxapine significantly decreased fecal MPA concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ) [G2 ( $5.99 \pm 3.69$ ) vs G4 ( $1.62 \pm 0.47$ )  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test] with a slight decrease in MPAG concentrations [G2 ( $1.23 \pm 0.50$ ) vs G4 ( $0.49 \pm 0.39$ )  $p > 0.05$ , Mann-Whitney test] in mice.

Structural changes induced by MMF in the proximal colon were also prevented by the combination with amoxapine [colon tissue/total section area (%) for G1 ( $90 \pm 7$ ) vs G2 ( $68 \pm 8$ )  $p < 0.05$ ; G1 vs G3 ( $85 \pm 6$ )  $p > 0.05$  and G3 vs G4 ( $83 \pm 9$ )  $p > 0.05$ ; ANOVA, Bonferroni post-hoc].

**Conclusion:** Our results support the central role of local exposure to MPA in the pathophysiology of mycophenolate-induced enteropathy. Further investigations will decipher the cellular and molecular mechanisms.

43

#### Role of immune checkpoints and activated helper and cytotoxic T-cells in drug-induced liver injury (DILI)

Alejandro Cueto-Sanchez<sup>1</sup>, Judith Sanabria-Cabrera<sup>1,2</sup>, Mercedes Robles-Diaz<sup>1,3</sup>, Aida Ortega-Alonso<sup>1</sup>, Miren Garcia-Cortes<sup>1,3</sup>, Enrique del Campo-Herrera<sup>1</sup>, Rocio Gonzalez-Grande<sup>4</sup>, Miguel Jimenez<sup>4</sup>, Francisco Ruiz-Cabello<sup>5</sup>, Raul J Andrade<sup>1,3</sup>, Dr Camilla Stephens<sup>1,3</sup>, M Isabel Lucena<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Farmacología Clínica and UGC Aparato Digestivo, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

<sup>2</sup>Platform ISCIII for Clinical Research Clinical Trials UICEC-IBIMA, Málaga, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área Temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Madrid, Spain

<sup>4</sup>Servicio de Aparato Digestivo, IBIMA, Hospital Universitario Regional de Málaga, Málaga, Spain

<sup>5</sup>Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, UGC de Laboratorio Clínico, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

**Introduction:** Idiosyncratic DILI is a challenging condition, believed to involve the immune system. This hypothesis is supported by the identification of various HLA risk alleles.

**Objectives:** To evaluate a potential role of the immune system in DILI through leukocyte immunophenotyping using flow cytometry.

**Methods:** Blood samples were collected from adjudicated DILI (n=12) and viral hepatitis (VH, 13) at day 1 (recognition), day 7 and day >30. Blood samples from healthy liver controls (HLC, 54) were extracted at a single time point. Leukocyte populations and immune checkpoint expressions were determined based on cell surface receptors, except for CTLA-4 that was determined intracellularly, using multiparametric flow cytometry (BD FACSVerser).

**Results:** No differences were detected in leukocytes, lymphocytes or neutrophils cell counts at day 1 between the three populations. However, both DILI ( $0.57 \times 10^9/\text{L}$ ,  $p=0.037$ ) and HV ( $1.41 \times 10^9/\text{L}$ ,  $p<0.0001$ ) had increased monocyte levels compared with HLC ( $0.35 \times 10^9/\text{L}$ ). At day 1 DILI presented significantly higher levels of activated helper T-cells (CD4+/DR+) and activated cytotoxic T-cells (CD8+/DR+) than HLC (14% vs 6.3%,  $p<0.0001$ ; 31% vs 15%,  $p=0.0003$ , respectively). The same trend was detected for VH. A strong correlation between activated CD4+ and CD8+ elevation was found in DILI ( $r=0.85$ ,  $p<0.001$ ), but less in VH ( $r=0.58$ ,  $p=0.0015$ ). With regards to helper T-cell subpopulations, DILI had significantly higher level of Th1 (52% vs 42%,  $p=0.0358$ ), while VH had lower level of Th9 compared with HLC (13% vs 18%,  $p=0.0112$ ). No other significant differences in lymphocyte populations were detected for DILI. Regarding immune checkpoint expressions on CD4+, DILI presented higher intracellular CTLA-4 level than HLC (28% vs 18%,  $p=0.0192$ ). VH presented higher level of both CTLA-4 (30% vs 18%,  $p=0.0068$ ) and PD-1 (23% vs 9.1%,  $p=0.0005$ ) than HLC. Significantly higher expression

of checkpoint ligand PD-1L on monocytes was also found in DILI (5.3% vs 3.4%,  $p=0.0452$ ) and VH (9.1% vs 3.4%,  $p<0.0001$ ). The level of all leukocyte populations and checkpoint expressions in DILI and VH approached HLC levels in the later samples, except for CD28 and CD86 that are constitutively expressed.

**Conclusion:** Our findings suggest that an adaptive immune response is involved in DILI in which activated CD4+ and CD8+ T-cells play an important role. Increased expression of negative immune checkpoints and ligands reflects restoration of immune homeostasis. Funding: PI16/01748, PI19/00883, CIBERehd-ISCIII

48

#### PLASMA AND URINARY CONCENTRATIONS OF ARACHIDONIC ACID-DERIVED EICOSANOIDS ARE ASSOCIATED WITH DIABETIC KIDNEY DISEASE

Miss Sonia Mota Zamorano<sup>1</sup>, Mr Nicolás R Robles<sup>2</sup>, Mr Juan López-Gómez<sup>2</sup>, Mrs Bárbara Cancho<sup>2</sup>, Miss Luz M González<sup>1</sup>, Mrs Guadalupe García-Pino<sup>4</sup>, Mrs María Luisa Navarro-Pérez<sup>5</sup>, Mr Guillermo Gervasini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical and Surgical-Therapeutics, Division of Pharmacology, University of Extremadura, Badajoz, Spain

<sup>2</sup>Service of Nephrology, Badajoz University Hospital, Badajoz, Spain

<sup>3</sup>Service of Clinical Analyses, Badajoz University Hospital, Badajoz, Spain

<sup>4</sup>Service of Nephrology, Zafra Hospital, Zafra, Spain

<sup>5</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Extremadura, Badajoz, Spain

**Introduction:** Diabetic kidney disease (DKD) is one of the main complications of diabetes mellitus and the most common cause of end-stage renal disease.

In the last years, some studies have pointed to the epoxygenase pathway of arachidonic acid (AA) metabolism as a route that might be deeply involved in the mechanisms underlying DKD.

**Objective:** We aimed to determine whether plasma and/or urinary levels of dihydroxyeicosatrienoic (DHETs) and 20-hydroxyeicosatetraenoic (20-HETE) acids are associated with DKD.

**Methods:** A total of 334 subjects (132 DKD patients and 202 non-diabetic individuals) were studied. Plasma levels of 11,12-DHET, 14,15-DHET and 20-HETE were measured by LC/MS/MS. Urinary 20-HETE concentrations were determined by immunoenzymatic assay.

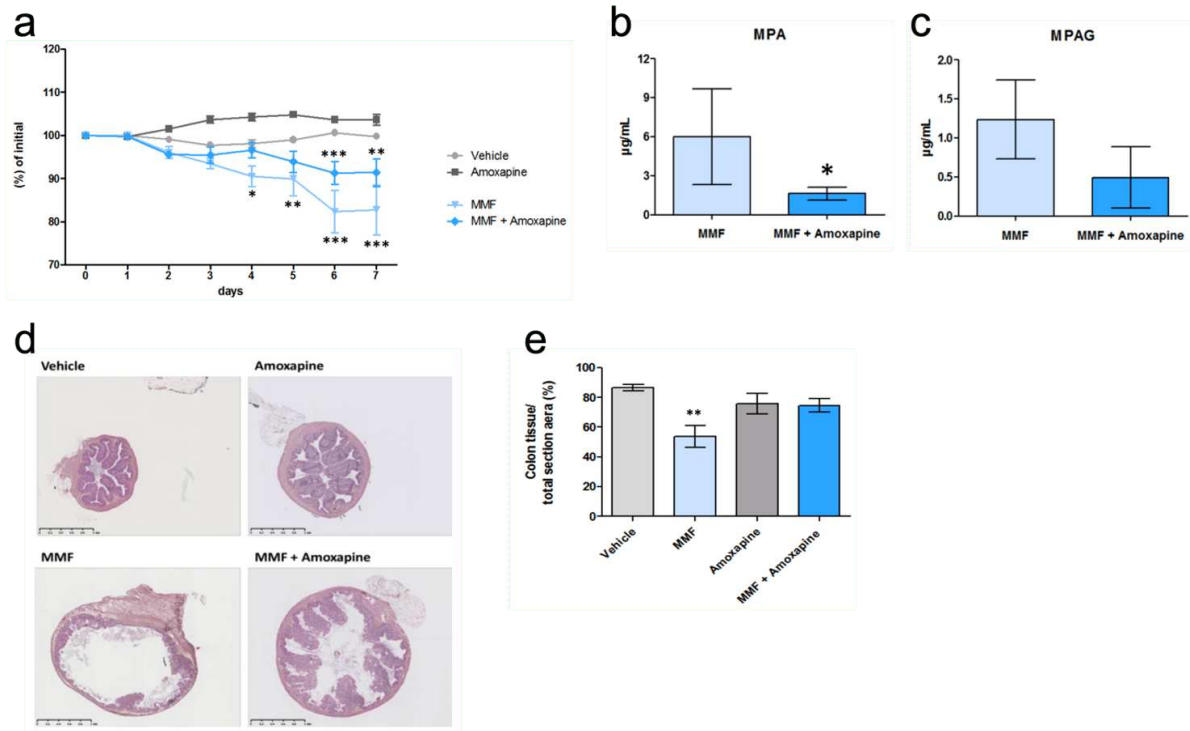
**Results:** Subjects with normoalbuminuria had larger 20-HETE-to-creatinine urinary ratios (20-HETE/Cr) than those with micro and macroalbuminuria ( $p=0.012$ ). Likewise, participants with  $\text{eGFR}>60 \text{ mL/min/1.732}$  had higher plasma levels of 14,15-DHET ( $p=0.039$ ) and 20-HETE/Cr ratios ( $p=0.007$ ). Concentrations of 14,15-DHET, 11,12-DHET and 20-HETE/Cr were significantly lower in DKD patients. Median values for non-diabetic vs. DKD were, respectively, 493 (351-691.5) vs. 358 (260.5-522)  $\text{ng/L}$ ,  $p=3\text{e-}5$ ; 262 (183.5-356) vs. 202 (141.5-278)  $\text{ng/L}$ ,  $p=1\text{e-}4$  and 5.26 (1.68-11.65) vs. 2.53 (1.01-6.28)  $\text{ng/mgCr}$ ,  $p=0.010$ . In addition, 20-HETE/Cr ratios were higher in patients with non-proteinuric DKD than in those with typical DKD ( $p=0.020$ ). When only individuals with impaired filtration were considered, 14,15-DHET and 11,12-DHET levels were still higher in non-diabetic subjects ( $p=0.002$  and  $p=0.006$ , respectively).

**Conclusions:** Our results indicate that AA-derived eicosanoids may play a relevant role in DKD.

49

#### An experimental model to simulate binge ingestion of alcohol and energy drinks in a laboratory setting

MD Olga Hladun<sup>1,2</sup>, PhD, MD Clara Pérez-Mañá<sup>1,2</sup>, PhD, MD Esther Papaseit<sup>1,2</sup>, PhD student Lourdes Poyatos<sup>1,2</sup>



Expérience de co-traitement de souris avec du MMF et de l'amoxapine (inhibiteur connu de la  $\beta$ -glucuronidase). Ce co-traitement retarde la perte de poids lié au MMF (**a**). Une diminution significative de la concentration de MPA (**b**) au niveau fécal ainsi qu'une tendance à la diminution de MPAG (**c**). L'analyse histologique des coupes de côlon proximal indique que le co-traitement à l'amoxapine prévient les dommages histologiques induits au MMF (**d** et **e**).  $n=8$  dans chaque groupe. *Les résultats du poids ont été analysés avec un test ANOVA à 2 facteurs avec un post-test de Bonferonni, ceux des concentrations en MPA et MPAG avec un test T de Student non apparié, et l'analyse histologique avec un test ANOVA à 1 facteur suivi d'un post-test de Bonferonni.*



# Is Intestinal Dysbiosis-Associated With Immunosuppressive Therapy a Key Factor in the Pathophysiology of Post-Transplant Diabetes Mellitus?

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jian-Quan Luo,  
Central South University, China

### Reviewed by:

Brian J Bennett,  
United States Department of  
Agriculture, United States

### \*Correspondence:

Roland Lawson  
roland.lawson@unilim.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Diabetes: Molecular Mechanisms,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 18 March 2022

**Accepted:** 06 June 2022

**Published:** 07 July 2022

### Citation:

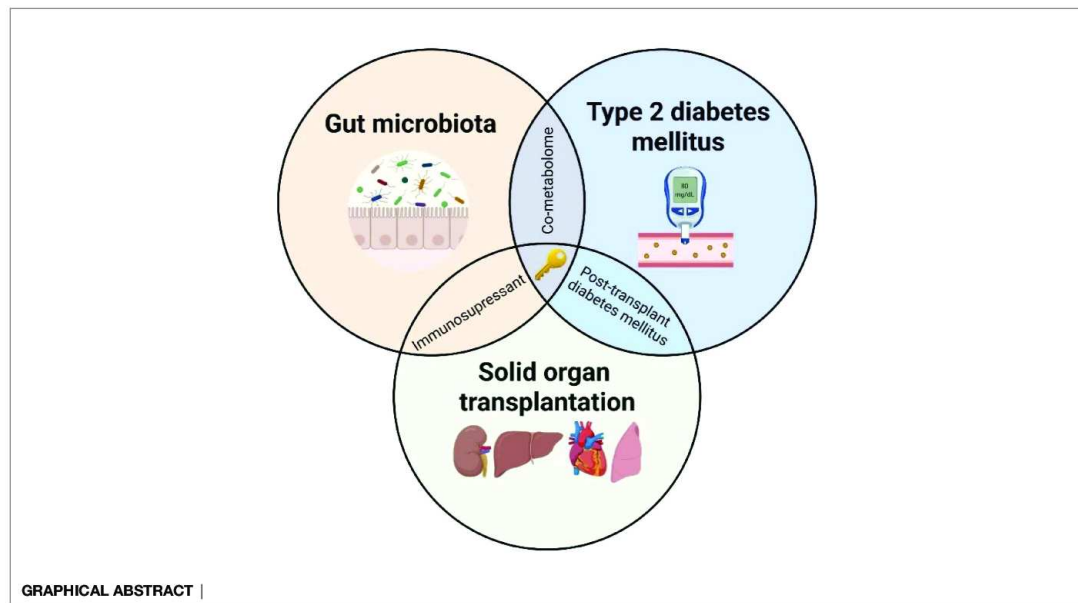
Faucher Q, Jardou M, Brossier C,  
Picard N, Marquet P and Lawson R  
(2022) Is Intestinal Dysbiosis-  
Associated With Immunosuppressive  
Therapy a Key Factor in the  
Pathophysiology of Post-Transplant  
Diabetes Mellitus?  
*Front. Endocrinol.* 13:898878.  
doi: 10.3389/fendo.2022.898878

Quentin Faucher<sup>1</sup>, Manon Jardou<sup>1</sup>, Clarisse Brossier<sup>1</sup>, Nicolas Picard<sup>1,2</sup>,  
Pierre Marquet<sup>1,2</sup> and Roland Lawson<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> University of Limoges, Inserm U1248, Pharmacology & Transplantation, Limoges, France, <sup>2</sup> Department of pharmacology, toxicology and pharmacovigilance, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Limoges, Limoges, France

Post-transplant diabetes mellitus (PTDM) is one of the most common and deleterious comorbidities after solid organ transplantation (SOT). Its incidence varies depending on the organs transplanted and can affect up to 40% of patients. Current research indicates that PTDM shares several common features with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in non-transplant populations. However, the pathophysiology of PTDM is still poorly characterized. Therefore, ways should be sought to improve its diagnosis and therapeutic management. A clear correlation has been made between PTDM and the use of immunosuppressants. Moreover, immunosuppressants are known to induce gut microbiota alterations, also called intestinal dysbiosis. Whereas the role of intestinal dysbiosis in the development of T2DM has been well documented, little is known about its impacts on PTDM. Functional alterations associated with intestinal dysbiosis, especially defects in pathways generating physiologically active bacterial metabolites (e.g., short-chain fatty acids, trimethylamine N-oxide, indole and kynurenine) are known to favour several metabolic disorders. This publication aims at discussing the potential role of intestinal dysbiosis and dysregulation of bacterial metabolites associated with immunosuppressive therapy in the occurrence of PTDM.

**Keywords:** post-transplant diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, immunosuppressant, intestinal dysbiosis, bacterial metabolites



## 1 INTRODUCTION

Solid organ transplantation (SOT) is the best replacement therapy in numerous cases of organ failure or end-stage organ dysfunction (e.g., kidney, liver, heart, or lung). Immune tolerance of the transplanted organ requires a complex and life-long immunosuppressive therapy, involving combinations of drugs from six main classes: 1) anti-proliferative agents (azathioprine, mycophenolic acid); 2) calcineurin inhibitors (cyclosporine, tacrolimus); 3) mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors (sirolimus, everolimus); 4) co-stimulation blockers targeting CD80/CD86 (belatacept); 5) anti-lymphocyte polyclonal or monoclonal antibodies (e.g., anti-thymocyte globulins, basiliximab); and 6) corticosteroids (e.g., prednisolone) (1, 2). The immunosuppressive strategy along time consists of: an induction phase that involves anti-lymphocyte antibodies, corticosteroids and the use of higher doses of “maintenance” immunosuppressants such as antimetabolites and calcineurin inhibitors; a life-long maintenance phase with different combinations of classes 1 to 4 with or without corticosteroids (3); and treatment of rejection, using boluses of corticosteroids, anti-thymocyte globulins, increased doses of maintenance drugs, and potentially other drugs in case of antibody-mediated rejection (ABMR) (4). Unfortunately, these therapeutic regimens increase the risk of opportunistic bacterial, viral, and fungal infections (5) and expose patients to numerous adverse effects and several metabolic disorders.

Post-transplant diabetes mellitus (PTDM) is a common and deleterious co-morbidity, which significantly contributes to

adverse outcome. PTDM is an endocrine and metabolic disease characterized by a dysfunction of pancreatic  $\beta$ -cell, insulin resistance, and high blood glucose. Among the risk factors of PTDM, several are common with type 2 diabetes mellitus (T2DM) (e.g., age, abdominal obesity) whereas others are transplant-specific (e.g., immunosuppressive drugs with diabetogenic properties, infection, and post-transplant weight gain) (6, 7). Immunosuppressive drugs can influence gut homeostasis through an impact on intestinal epithelial cells or organs associated with the digestive tract and induce changes in the richness and diversity of the gut microbiota. This drug-microbiota relationship may directly or indirectly affect the anti-rejection treatment efficacy as well as disrupt the microbiota balance and favour the development of metabolic disorders (8).

Although preventative and therapeutic strategies are being deployed to prevent PTDM, its incidence remains high. To improve the effectiveness of such strategies, it is necessary to better understand PTDM pathophysiology. Our hypothesis is that modifications of the gut microbiome, also named intestinal dysbiosis, a well-known contributor to type 2 diabetes mellitus (T2DM) in the non-transplant population, play an even larger role in the pathogenesis of PTDM. To substantiate this hypothesis, we herein provide a picture of the impact of SOT and immunosuppressive therapy on the gut homeostasis including gut microbiota. Subsequently, we discuss the potential role of intestinal dysbiosis in the development of PTDM based on knowledge gained from T2DM and provide arguments in favour of monitoring the microbiota diversity and function to decipher PTDM pathophysiology.

## 2 CURRENT KNOWLEDGE ON POST-TRANSPLANT DIABETES MELLITUS

### 2.1 Diagnosis and Incidence

PTDM is one of the most important comorbidities associated with SOT. The evaluation of its incidence among transplant patients has suffered from the lack of a consensual definition. The first international consensus guidelines about new-onset diabetes after transplantation (NODAT) were published in 2003 (9). A second international consensus conference was held in 2013 to review the criteria and available evidence and proposed an update to the previous guidance (10). Among many recommendations, the first was to enlarge the notion of NODAT to that of PTDM. PTDM encompasses several complex clinical entities and includes hyperglycemia in the post-transplant period resulting from known or unknown pre-existing diabetes, insulin resistance or insulinopenia, transient hyperglycemia, and NODAT. Therefore, this definition encompasses pre-transplant in addition to “new-onset” diabetes (10). Currently, the different diagnostic criteria for PTDM (Table S1) are based on those of the American Diabetes Association and on the World Health Organization criteria for non-transplant patients (11).

The incidence of PTDM ranges from 10 to 40% depending on the transplanted organ. Recently, PTDM has been reported to occur in 10–20% of kidney, 20–40% of liver or lung, and 20–30% of heart transplant recipients (6). These large ranges may be explained by the type of organ, the presence of modifiable and non-modifiable risk factors, and the follow-up duration (5). The development of diabetes in transplant recipients is associated with a higher risk of graft failure, patient death, and other adverse outcomes (e.g., cardiovascular disease and infection) (12). More specifically, PTDM is associated with a higher incidence of cardiovascular disease for liver and kidney transplant recipients (13, 14). Heart transplant recipients with PTDM present an increased risk of comorbidities and premature death (15). Moreover, PTDM in lung transplant recipients is associated with shorter survival (16).

### 2.2 Pathogenesis and Risk Factors

PTDM shares common features with type 2 diabetes mellitus (T2DM) such as insulin resistance, hypertriglyceridaemia, cardiovascular events, and chronic low-grade inflammation. Hyperglycaemia in PTDM is associated with pancreatic  $\beta$ -cells dysfunction and decreased insulin sensitivity (6, 17). Studies in PTDM patients reported impaired insulin-mediated glucose uptake in peripheral tissue, impaired insulin-mediated suppression of hepatic glucose output (18) and insufficient incretin release leading to an increase of glucagon release by the pancreas (19). Pre-existing risk factors common to PTDM and T2DM, such as age, abdominal obesity, family history, and ethnicity favour the development of PTDM. The morphotype in the pre-transplant period could predict to some extent the development of PTDM in kidney transplant recipients (20). Moreover, several T2DM-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs) in interleukin genes (e.g., IL-7R, IL-2, and IL-17R) are associated with increased pro-inflammatory pathways and PTDM development (21, 22).

Among transplant-related risks factors, numerous studies have demonstrated the involvement of certain immunosuppressive drugs in the development of NODAT. Calcineurin inhibitors dysregulate the function and growth of pancreatic  $\beta$ -cells through the calcineurin/NFAT signalling pathway. Corticosteroids are known to decrease the secretion of, and sensitivity to, insulin (23). Sirolimus favours insulin resistance and decreases pancreatic  $\beta$ -cell proliferation too (24). Consistently, mTOR inhibitors are associated with a higher risk of PTDM (25). Above all, recent analysis pointed toward the contribution of immunosuppressants to the dysregulation of genes involved in insulin production and secretion (24). Viral infections are a source of inflammation and represent yet another risk factor of PTDM. Numerous studies have reported an increased risk of PTDM in kidney and liver transplant recipients positive for the hepatitis C virus (HCV) (26–28) or in kidney transplant recipients positive for the cytomegalovirus (CMV) (29). Although associations between these viral infections and PTDM are generally attributed to the promotion of a pro-inflammatory environment as well as to pancreatic  $\beta$ -cell dysfunctions, extensive studies are missing.

Actually, the preventative strategies against PTDM involve lifestyle (e.g., dietary, physical activity) modifications or adapted immunosuppressive regimens (30). However, the frequency of PTDM has not decreased significantly over the last decade, suggesting that current knowledge is not sufficient and that uncharacterized phenomena contribute to PTDM. Several risk factors presented above (e.g., obesity, immunosuppression, infection) are accompanied by an imbalance in the diversity of the gut microbiome, called intestinal dysbiosis, metabolic disorders and increased intestinal permeability. These alterations are well known to favour T2DM in the non-transplant population (31). Therefore, the drastic dynamic changes of the gut microbiota during SOT may contribute even more to the pathogenesis of PTDM.

## 3 ALTERATIONS OF GUT HOMEOSTASIS IN SOLID ORGAN TRANSPLANTATION

Gut homeostasis is highly dependent on the intimate crosstalk between the gastrointestinal tract and the gut microbiota. The gut microbiota represents the populations of commensal microorganisms that reside in the gastrointestinal tract and participate in the intestinal barrier integrity. Recent scientific advances have underlined the fundamental role of this microbiota in the regulation of the immune system, as well as the close relationship between intestinal dysbiosis and the occurrence of numerous local or systemic diseases (mainly cardiovascular or metabolic disorders) (32, 33). The gut microbiota may therefore represent an actionable target to improve immune tolerance and long-term graft survival. The diversity, richness, and activity of its resident microorganisms are constantly being modified under the influence of various factors (e.g., genetic, dietary, environmental, and therapeutic). It is worth mentioning that in transplantation, the nature of the transplanted organ, the various pre- and post-transplant

pathologies, and multiple therapies accentuate the gut microbiota variability. The dynamic changes of the gut microbiota have been widely studied in some diseases, but very seldom in transplant patients. We summarize below current knowledge about the relationships between the gut microbiota and SOT outcomes (Figure 1A), including the impact of the immunosuppressive protocol and the occurrence of post-transplant co-morbidities.

### 3.1 Dynamic Changes of the Gut Microbiota in Transplant Patients

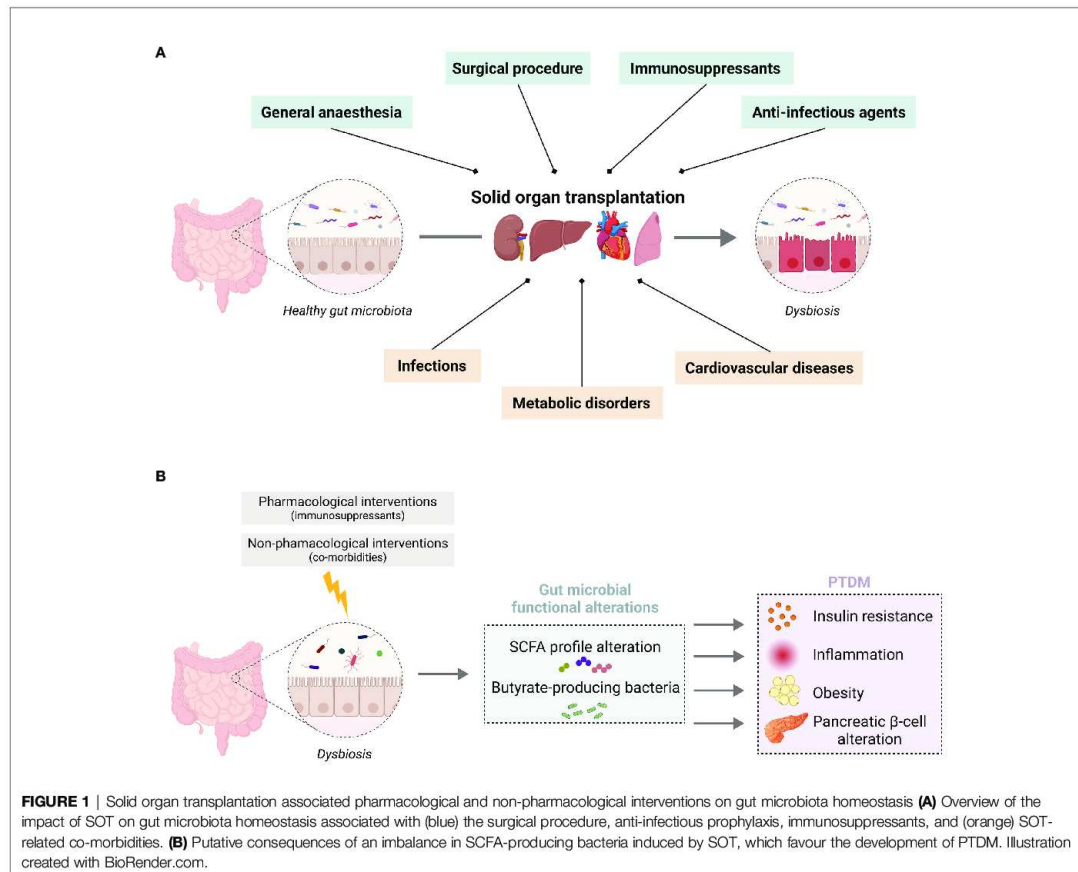
The surgical procedure of transplantation which is generally an abdominal act, represents a high risk of intestinal dysbiosis (34, 35). Regarding the post-transplantation period, a cohort study in kidney transplant recipients reported changes in gut microbial diversity in favour of an increase in Proteobacteria, a phylum that includes potentially virulent pathogens (e.g., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) (36). The faecal microbial diversity was decreased in some patients with post-transplant complications (diarrhoea, acute rejection, urinary tract

infection) (37). In addition, the diversity of the gut microbiota was significantly lower and the levels of Proteobacteria higher with abundant *Escherichia coli* in kidney transplant recipients compared to healthy control (38). In liver transplant recipients, this diversity transiently decreased two weeks after transplantation and then gradually increased back to reach the pre-transplantation levels after 5 weeks (39). Anti-infectious agents used in transplanted patients to prevent opportunistic infections, mainly antibiotics, are known to affect the gut microbiota homeostasis and to promote intestinal dysbiosis (36, 40).

### 3.2 Effect of the Immunosuppressive Therapy on the Gut Homeostasis

#### 3.2.1 Interactions Between the Immunosuppressive Drugs and the Gut Microbiota

A recent review from Gabarre *et al.* has provided a thorough overview of the bidirectional interaction between the immunosuppressants and the gut microbiota (8). The use of the anti-proliferative agent, mycophenolic acid, initially known for its antibacterial, antifungal and antiviral properties, is associated to a



decrease in the diversity of the gut microbiota in kidney transplant recipients (38, 41). Further investigations in preclinical models have revealed an alteration of the intestinal microbiota in mycophenolic acid-treated mice with an expansion of bacteria belonging to the Proteobacteria phylum (42, 43). In addition, a decrease of bacterial metabolites was also observed in a mouse model of mycophenolate-induced enteropathy (44). Mycophenolic acid is thought to selectively promote the expansion of  $\beta$ -glucuronidase-expressing bacteria of Enterobacteriaceae family (42, 43). The bacterial  $\beta$ -glucuronidase activity promotes enterohepatic recirculation of mycophenolic acid and increases its exposure to intestinal epithelial cells that could probably explain the occurrence of gastrointestinal adverse effects. Regarding corticosteroids, rats treated orally with dexamethasone sodium phosphate showed a decrease in the richness and diversity of their gut microbiota (45). Prednisolone-treated mice showed a reduction in the population of Bacteroidetes and an increase in Firmicutes in faecal samples (46). For calcineurin inhibitors, a study reported altered microbiota in high-dose tacrolimus-treated mice (8, 47). Another study based on intraperitoneal injection of tacrolimus in rats showed that the relative abundance of several bacterial species in the faeces was decreased (48). The composition of the gut microbiota can affect the metabolism of tacrolimus as some commensal gut bacteria (e.g., *Faecalibacterium prausnitzii*) have been shown to convert it to less potent metabolites (49).

These studies showed in the one hand, that several immunosuppressive drugs induced intestinal dysbiosis leading to change in microbial diversity favouring the increase of opportunistic pathogens and in other hand, that the gut microbiota influenced the immunosuppressive drugs metabolism and efficacy. However, the characteristics of gut microbiota changes differ across drugs and studies and systematic and longitudinal investigations that could provide insight into these trends are still lacking. However, the above-mentioned review lists the immunosuppressants inducing intestinal dysbiosis and provides an overview of the related changes in the microbiota (8).

### 3.2.2 Immunosuppressive Drugs Impacts on Intestinal Barrier Integrity and Pancreas Homeostasis

In transplant patients, immunosuppressive drugs can alter the intestinal barrier integrity and favour intestinal permeability. Intestinal permeability is characterized by a loss of the gut epithelial wall integrity allowing different sizes of compounds to enter the systemic circulation (food antigens, commensal or pathogens bacteria, and their metabolites) (50). By using an intestinal epithelial cell line, Qasim *et al.* have demonstrated the potential of mycophenolic acid to alter tight junction proteins expression and distribution and induce intestinal permeability that may be responsible for gastrointestinal adverse effects observed in transplant patients (51). This intestinal permeability could also have deleterious consequences such as chronic systemic inflammation (52). Another study has demonstrated that tacrolimus and sirolimus by inhibiting cell viability and inducing reactive oxygen species formation, can promote major changes in intestinal barrier function (53).

The immunosuppressive drugs can also alter the homeostasis of organs associated with the digestive tract. We herein only focus on the influence of the pancreas homeostasis as it plays a key role in the regulation of nutrient digestion by releasing digestive enzymes and glucose homeostasis (54). Some rare cases of drug-induced pancreatitis have been reported under tacrolimus (55) or mycophenolic acid (56) treatments. However, there is no strong evidence of the direct impact of the immunosuppressive drug on the pancreas homeostasis that could rationalize the occurrence of PTDM. Therefore, the whole impact of the environment (i.e., dysbiosis, immunosuppressive therapy, co-morbidities) could account for the development of PTDM.

### 3.3 Impact of SOT-Related Co-Morbidities on the Gut Microbiota

In the first months post-transplantation, patients are at high risk of developing infections due to a weakened immune system. Serious infections can be caused by commensal or nosocomial bacterial (e.g., *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*), viral (e.g., cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, influenza) or fungal (e.g., *Candida* or *Aspergillus* species) pathogens (57). *Clostridium difficile*, a frequent perpetrator of nosocomial infection (7.4% prevalence in SOT patients), is linked with the emergence of intestinal dysbiosis (58, 59). Gut microbiome alteration is frequently associated with these infections and is characterized by an enrichment of opportunistic pathogens and a depletion of beneficial commensals (60, 61). For example, a preclinical study has reported variations in gut microbiota diversity in cytomegalovirus-infected mice (62).

The main metabolic complications after SOT include PTDM, non-alcoholic fatty liver disease, dyslipidaemia, and obesity. These metabolic disorders may increase the risk of cardiovascular events (hypertension, coronary artery disease, stroke, arteritis) and affect post-transplant graft outcomes (63–66). For instance, non-alcoholic fatty liver disease is associated with an increase in Proteobacteria, leading to gut dysbiosis (67, 68). Immunosuppressive drugs such as corticosteroids and calcineurin inhibitors can favour hypertension and weight gain (69). This weight gain of SOT patients is critical in post-transplant period, since obesity has been significantly associated with a higher overall mortality and reduced allograft survival particularly in renal transplant patients (70). These metabolic complications can have a deleterious effect on gut microbiota homeostasis. Obesity affect the diversity of intestinal microbiota, with an increase in Firmicutes and a reduction of Bacteroidetes in a mice model (71). Intestinal dysbiosis has been observed in obese people, with an increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio (72).

In summary, SOT therapy is accompanied by intestinal dysbiosis arising from a combination of factors including lifestyle and dietary changes, surgical procedure, and pharmacological treatments (e.g., anti-infectious prophylaxis, immunosuppressant). Regarding the gut microbiota-diabetes relationship, several studies have demonstrated a huge diversity imbalance in diabetes patients (31). Given the predominant role of this dysbiosis in the pathogenicity of T2DM, the hypothesis of its involvement in PTDM seems strong.

#### 4 POTENTIAL INVOLVEMENT OF INTESTINAL DYSBIOSIS TO THE PATHOPHYSIOLOGY OF PTDM

In this section, we will put an accent on the gut microbiome changes observed in transplant recipients that are common with non-transplant T2DM. In this context, we will describe the putative impact of intestinal dysbiosis on the bacterial metabolites and more precisely on short-chain fatty acids (SCFA) and their possible role in the development of PTDM (Figure 1B).

As previously mentioned, several immunosuppressive drugs induce intestinal dysbiosis, generally characterised by a reduction in the phylum of Bacteroidetes, contrasting with an expansion of the phylum of Firmicutes (73). The same tendency has been observed in T2DM patients (74). This increased Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio was associated with an impairment of nutrient absorption and glucose tolerance, which pave the way for T2DM (73). Moreover, the relative abundance of Proteobacteria is increased in kidney and liver transplant recipients (36, 38), similarly to T2DM patients (74, 75). Some bacterial strains belonging to this phylum are known to favour pathogenic infections (e.g., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) (36, 38). Gut microbiome changes can induce global metabolic disorders. Indeed, the gut bacterial ecosystem ensures the production of microbial metabolites (e.g., SCFA, trimethylamine N-oxide, indole and kynurenine). These metabolites constitute the communication system of the host-microbiome crosstalk (76). Among them, SCFA are the most commonly studied small metabolites produced by the gut microbiota and they represent a robust link between the microbiota and systemic inflammatory diseases, as demonstrated by recent studies (33, 75).

SCFA, and more precisely acetate, propionate, and butyrate, come from the fermentation of indigestible carbohydrates. SCFA are pharmacologically active and can exert their numeral pharmacological functions by either stimulating G-protein-coupled receptors (GPCR41/43/109A) or can be absorbed by colonocytes through multiple monocarboxylate transporters (e.g., sodium-coupled monocarboxylate transporters (SMCT1), monocarboxylate transporter (MCT1/4/5) (77). In the systemic circulation, they can participate in the regulation of several organs (e.g., liver, lung, brain) (33, 78, 79). For example, they can decrease allergic inflammation in the lungs, or can be used as a source of energy by the kidneys, the myocardium and other muscles (80). SCFA facilitate IL-10 synthesis through the polarization of T-cells towards regulatory T-cells, which exhibits anti-inflammatory properties (81). They also exert a positive effect on intestinal cell homeostasis through the maintenance of the epithelial barrier function through the expression of tight junctions that decrease intestinal permeability (82).

Alteration of SCFA profiles has been observed in T2DM patients, with a significant reduction of faecal propionate and butyrate concentrations as compared to control subjects (83). Moreover, a metagenome-wide association study showed a decrease in the abundance of some universal butyrate-producing bacteria in T2DM patients such as those observed in transplant recipients (8, 47, 84). A European cohort study reported the

decrease of butyrate-producing bacteria (such as *Roseburia* species and *Faecalibacterium prauznitzii*) in the gut microbiota of women with T2DM (85). These studies provide evidence that T2DM and SOT have in common SCFA-producing taxa alterations leading to decreased SCFA production. Butyrate and propionate influence glucose metabolism through the activation of intestinal gluconeogenesis, while acetate and propionate are substrates for gluconeogenesis and lipogenesis in the liver (86). SCFA play a role in blood glucose concentration by favouring the secretion of incretin hormones, as demonstrated by the butyrate-induced secretion of glucagon-like peptide 1 (GLP1) in a pre-clinical model (87). At the cellular level, the binding of SCFA to GPR41 and GPR43 in the enteroendocrine L-cells leads to increased GLP1 and peptide YY levels, which improve cell sensitivity to insulin and promote satiety. Furthermore, SCFA play a protective role against obesity and insulin resistance (73, 88) and have anti-inflammatory properties, especially butyrate. A decrease of butyrate-producing bacteria may favour metabolic inflammation, which in turn clearly induces insulin resistance and foster T2DM development (75). At the opposite, incubation of neutrophils with SCFA *in vitro* suppressed pro-inflammatory makers increased in T2DM, such as IL-6 and TNF- $\alpha$  (89). A recent experimental study showed that butyrate and acetate protected pancreatic  $\beta$ -cells against stressful conditions and alleviated metabolic stressor-induced apoptosis, mitochondrial dysfunction and ROS overproduction (88). Moreover, by stimulating their receptors, SCFA have been involved in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cells function and insulin secretion (90). Overall, these studies demonstrated the important role of SCFA in the pathophysiology of diabetes through various mechanisms of action, which have been well detailed in a recent review (89). The decreased richness of SCFA-producing bacteria in SOT may therefore promote and/or contribute to the development of PTDM.

#### 5 CONCLUSION

This article provides hints in favour of a possible association between intestinal dysbiosis and PTDM, based on complementary and coherent scientific evidence. Further investigations are required to reinforce the descriptive data available for SOT. Characterising gut microbiota composition would help to understand the mechanisms and/or to identify predictive biomarkers of PTDM. The measurement of SCFA concentrations in blood and/or faeces as indicators of the gut microbiota functionality in the pre- and post-transplant periods could also make the case stronger. Moreover, dietary supplementation with SCFA as a postbiotic could restore the gut microbiota homeostasis and constitute a complementary therapy for glucose lowering in PTDM. A recent paper stressed that the implementation of an effective PTDM prevention strategy requires relevant identification of at-risk patients, solid knowledge of its pathogenesis and early detection tools (30). Monitoring the gut microbiota in SOT would comply with these objectives since it could help decipher the pathophysiology PTDM and detect patients at increased risk early.



## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

QF, MJ and CB drafted the paper with the input of all authors. This work has been done under the supervision of NP, PM and

RL. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.898878/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Lee RA, Gabardi S. Current Trends in Immunosuppressive Therapies for Renal Transplant Recipients. *Am J Health Syst Pharm* (2012) 69(22):1961–75. doi: 10.2146/ajhp110624
- Jasiak NM, Park JM. Immunosuppression in Solid-Organ Transplantation: Essentials and Practical Tips. *Crit Care Nurs Q* (2016) 39(3):227–40. doi: 10.1097/CNQ.0000000000000117
- Claeys E, Vermeire K. Immunosuppressive Drugs in Organ Transplantation to Prevent Allograft Rejection: Mode of Action and Side Effects. *J Immunol Sci* (2019) 3(4):14–21. doi: 10.29245/2578-3009/2019/4.1178
- Fuehner T, Benden C, Gottlieb J. Initial Immunosuppression and Managing Rejection. *Intensive Care Med* (2019) 45(3):388–90. doi: 10.1007/s00134-018-05515-8
- Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med* (2007) 14:2601–14. doi: 10.1056/NEJMra064928
- Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, Dotta F, Haller H, Hernández D, et al. New-Onset Diabetes After Transplantation: 2003 International Consensus Guidelines. *Proc an Int Expert panel meeting* (2003) 75(10 Suppl):SS3–24. doi: 10.1097/01.TP.0000069952.49242.3E
- Sharif A, Hecking M, de Vries APJ, Porrini E, Hornum M, Rasoul-Rockenschaub S, et al. Proceedings From an International Consensus Meeting on Posttransplantation Diabetes Mellitus: Recommendations and Future Directions. *J Am Soc Transpl Surg* (2014) 14(9):1992–2000. doi: 10.1111/ajt.12850
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* (2021) 45(Supplement\_1):S17–38. doi: 10.2337/dc22-S002
- Jenssen T, Hartmann A. Post-Transplant Diabetes Mellitus in Patients With Solid Organ Transplants. *Nat Rev Endocrinol* (2019) 15(3):172–88. doi: 10.1038/s41574-018-0137-7
- Kuo HT, Sampaio MS, Vincenti F, Bunnapradist S. Associations of Pretransplant Diabetes Mellitus, New-Onset Diabetes After Transplant, and Acute Rejection With Transplant Outcomes: An Analysis of the Organ Procurement and Transplant Network/United Network for Organ Sharing (OPTN/UNOS) Database. *Am J Kidney Dis* (2010) 56(6):1127–39. doi: 10.1053/j.ajkd.2010.06.027
- Roccaro GA, Goldberg DS, Hwang WT, Judy R, Thomasson A, Kimmel SE, et al. Sustained Posttransplantation Diabetes Is Associated With Long-Term Major Cardiovascular Events Following Liver Transplantation. *J Am Soc Transpl Surg* (2018) 18(1):207–15. doi: 10.1111/ajt.14401
- Seoane-Pillado MT, Pita-Fernández S, Valdés-Cañedo F, Seijo-Bestilleiro R, Pértiga-Díaz S, Fernández-Rivera C, et al. Incidence of Cardiovascular Events and Associated Risk Factors in Kidney Transplant Patients: A Competing Risks Survival Analysis. *BMC Cardiovasc Disord* (2017) 17(1):72. doi: 10.1186/s12872-017-0505-6
- Kim HJ, Jung SH, Kim JJ, Yun TJ, Kim JB, Choo SJ, et al. New-Onset Diabetes Mellitus After Heart Transplantation—Incidence, Risk Factors and Impact on Clinical Outcome. *J Jpn Circ Soc* (2017) 81(6):806–14. doi: 10.1253/circj.CJ-16-0963
- Hackman KL, Snell GI, Bach LA. Poor Glycemic Control Is Associated With Decreased Survival in Lung Transplant Recipients. *Transplantation* (2017) 101(9):2200–6. doi: 10.1097/TP.0000000000001555
- Jenssen T, Hartmann A. Emerging Treatments for Post-Transplantation Diabetes Mellitus. *Nat Rev Nephrol* (2015) 11(8):465–77. doi: 10.1038/nrneph.2015.59
- Jørgensen MB, Hornum M, van Hall G, Bstrup C, Hansen JM, Mathiesen ER, et al. The Impact of Kidney Transplantation on Insulin Sensitivity. *J Eur Soc Organ Transpl* (2017) 30(3):295–304. doi: 10.1111/tri.12907
- Halden TAS, Egeland EJ, Åsberg A, Hartmann A, Midtvedt K, Khiabani HZ, et al. GLP-1 Restores Altered Insulin and Glucagon Secretion in Posttransplantation Diabetes. *Diabetes Care* (2016) 39(4):617–24. doi: 10.2337/dc15-2383
- Cron DC, Noon KA, Cote DR, Terjmanian MN, Augustine JJ, Wang SC, et al. Using Analytic Morphomics to Describe Body Composition Associated With Post-Kidney Transplantation Diabetes Mellitus. *Clin Transpl. sept* (2017) 31(9):e13040. doi: 10.1111/ctr.13040
- Kim YG, Ihm CG, Lee TW, Lee SH, Jeong KH, Moon JY, et al. Association of Genetic Polymorphisms of Interleukins With New-Onset Diabetes After Transplantation in Renal Transplantation. *Transplantation* (2012) 93(9):900–7. doi: 10.1681/ASN.2013040383
- Romanowski M, Domanski L, Pawlik A, Osekowska B, Dziedziczko V, Safranow K, et al. Interleukin-17 Gene Polymorphisms in Patients With Post-Transplant Diabetes Mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2015) 19(17):3152–6.
- Hecking M, Kainz A, Wertzowa J, Haidinger M, Döller D, Tura A, et al. Glucose Metabolism After Renal Transplantation. *Diabetes Care* (2013) 36(9):2763–71. doi: 10.2337/dc12-2441
- Bhat M, Pasini E, Das A, Baciu C, Angeli M, Humar A, et al. Diabetogenic Effects of Immunosuppression: An Integrative Analysis. *Transplantation* (2020) 104(1):211–21. doi: 10.1097/TP.0000000000002815
- Rysz J, Franczyk B, Radek M, Ciałkowska-Rysz A, Gluba-Brzózka A. Diabetes and Cardiovascular Risk in Renal Transplant Patients. *Int J Mol Sci* (2021) 22(7):3422. doi: 10.3390/ijms22073422
- Driscoll CJ, Cashion AK, Hathaway DK, Thompson C, Conley Y, Gaber O, et al. Posttransplant Diabetes Mellitus in Liver Transplant Recipients. *Prog Transplant Aliso Viejo Calif* (2006) 16(2):110–6. doi: 10.1177/152692480601600204
- Chen T, Jia H, Li J, Chen X, Zhou H, Tian H. New Onset Diabetes Mellitus After Liver Transplantation and Hepatitis C Virus Infection: Meta-Analysis of Clinical Studies. *Transpl Int* (2009) 22(4):408–15. doi: 10.1111/j.1432-2277.2008.00804.x
- Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Bunnapradist S, Kanwal F, Dulai G. Post-Transplant Diabetes Mellitus and HCV Seropositive Status After Renal Transplantation: Meta-Analysis of Clinical Studies. *Am J Transplant* (2005) 5(10):2433–40. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01040.x
- Einollahi B, Motalebi M, Salehi M, Ebrahimi M, Taghipour M. The Impact of Cytomegalovirus Infection on New-Onset Diabetes Mellitus After Kidney Transplantation: A Review on Current Findings. *J Nephropathol* (2014) 3(4):139–48. doi: 10.12860/jnp.2014.27
- Ducloux D, Courivaud C. Prevention of Post-Transplant Diabetes Mellitus: Towards a Personalized Approach. *J Pers Med* (2022) 12(1):116. doi: 10.3390/jpm12010116
- Tanase DM, Gosav EM, Neculae E, Costea CF, Ciocoiu M, Hurjui LL, et al. Role of Gut Microbiota on Onset and Progression of Microvascular Complications of Type 2 Diabetes (T2DM). *Nutrients* (2020) 12(12):E3719. doi: 10.3390/nu12123719

30. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Adv Immunol* (2014) 121:91–119. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9
31. Zhang Z, Tang H, Chen P, Xie H, Tao Y. Demystifying the Manipulation of Host Immunity, Metabolism, and Extraintestinal Tumors by the Gut Microbiome. *Signal Transduct Target Ther* (2019) 4:41. doi: 10.1038/s41392-019-0074-5
32. Stavrou G, Kotzampassi K. Gut Microbiome, Surgical Complications and Probiotics. *Ann Gastroenterol* (2017) 30(1):45–53. doi: 10.20524/aog.2016.0086
33. Bonavina L, Arini A, Ficano L, Iannuzziello D, Pasquale L, Aragona SE, et al. Post-Surgical Intestinal Dysbiosis: Use of an Innovative Mixture (Lactobacillus Plantarum LP01, Lactobacillus Lactis Subspecies Cremoris LLC02, Lactobacillus Delbrueckii LDD01). *Acta Bio-Medica Atenei Parm* (2019) 90(7-5):18–23. doi: 10.23750/abm.v90i7-S.8651
34. Wang W, Xu S, Ren Z, Jiang J, Zheng S. Gut Microbiota and Allogeneic Transplantation. *J Transl Med* (2015) 13(1):275. doi: 10.1186/s12967-015-0640-8
35. Lee JR, Muthukumar T, Dadhania D, Toussaint NC, Ling L, Pamer E, et al. Gut Microbial Community Structure and Complications Following Kidney Transplantation: A Pilot Study. *Transplantation* (2014) 98(7):697–705. doi: 10.1097/TP.0000000000000370
36. Swarte JC, Douwes RM, Hu S, Vich Vila A, Eisenga MF, van Londen M, et al. Characteristics and Dysbiosis of the Gut Microbiome in Renal Transplant Recipients. *J Clin Med* (2020) 9(2):E386. doi: 10.3390/jcm9020386
37. Kato K, Nagao M, Miyamoto K, Oka K, Takahashi M, Yamamoto M, et al. Longitudinal Analysis of the Intestinal Microbiota in Liver Transplantation. *Transplant Direct* (2017) 3(4):e144. doi: 10.1097/TXD.0000000000000661
38. Gabarre P, Loens C, Tamzali Y, Barrou B, Jaisser F, Tourret J. Immunosuppressive Therapy After Solid Organ Transplantation and the Gut Microbiota: Bidirectional Interactions With Clinical Consequences. *Am J Transplant* (2021) 22:1014–30. doi: 10.1111/ajt.16836
39. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate Mofetil and its Mechanisms of Action. *Immunopharmacology* (2000) 47(2):85–118. doi: 10.1016/S0162-3109(00)00188-0
40. Taylor MR, Flannigan KL, Rahim H, Mohamud A, Lewis IA, Hirota SA, et al. Vancomycin Relieves Mycophenolate Mofetil-Induced Gastrointestinal Toxicity by Eliminating Gut Bacterial  $\beta$ -Glucuronidase Activity. *Sci Adv* (2019) 5(8):eaax2358. doi: 10.1126/sciadv.aax2358
41. Flannigan KL, Taylor MR, Pereira SK, Rodriguez-Arguello J, Moffat AW, Alston L, et al. An Intact Microbiota is Required for the Gastrointestinal Toxicity of the Immunosuppressant Mycophenolate Mofetil. *J Heart Lung Transplant* (2018) 37(9):1047–59. doi: 10.1016/j.healun.2018.05.002
42. Jardou M, Provost Q, Brossier C, Pinaut É, Sauvage FL, Lawson R. Alteration of the Gut Microbiome in Mycophenolate-Induced Enteropathy: Impacts on the Profile of Short-Chain Fatty Acids in a Mouse Model. *BMC Pharmacol Toxicol* (2021) 22(1):66. doi: 10.1186/s40360-021-00536-4
43. Wu T, Yang L, Jiang J, Ni Y, Zhu J, Zheng X, et al. Chronic Glucocorticoid Treatment Induced Circadian Clock Disorder Leads to Lipid Metabolism and Gut Microbiota Alterations in Rats. *Life Sci* (2018) 192:173–82. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.049
44. Tourret J, Willing BP, Dion S, MacPherson J, Denamur E, Finlay BB. Immunosuppressive Treatment Alters Secretion of Ileal Antimicrobial Peptides and Gut Microbiota, and Favors Subsequent Colonization by Uropathogenic Escherichia Coli. *Transplantation* (2017) 101(1):74–82. doi: 10.1097/TP.0000000000001492
45. Zhang Z, Liu L, Tang H, Jiao W, Zeng S, Xu Y, et al. Immunosuppressive Effect of the Gut Microbiome Altered by High-Dose Tacrolimus in Mice. *Am J Transplant* (2018) 18(7):1646–56. doi: 10.1097/01.tp.0000542540.14037.ad
46. Bhat M, Pasini E, Copeland J, Angeli M, Husain S, Kumar D, et al. Impact of Immunosuppression on the Metagenomic Composition of the Intestinal Microbiome: A Systems Biology Approach to Post-Transplant Diabetes. *Sci Rep* (2017) 7(1):10277. doi: 10.1038/s41598-017-10471-2
47. Guo Y, Crnkovic CM, Won KJ, Yang X, Lee JR, Orjala J, et al. Commensal Gut Bacteria Convert the Immunosuppressant Tacrolimus to Less Potent Metabolites. *Drug Metab Dispos* (2019) 47(3):194–202. doi: 10.1124/dmd.118.084772
48. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal Permeability – a New Target for Disease Prevention and Therapy. *BMC Gastroenterol* (2014) 14(1):189. doi: 10.1186/s12876-014-0189-7
49. Qasim M, Rahman H, Ahmed R, Oellerich M, Asif AR. Mycophenolic Acid Mediated Disruption of the Intestinal Epithelial Tight Junctions. *Exp Cell Res* (2014) 322(2):277–89. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.021
50. Vanuytsel T, Tack J, Farre R. The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. *Front Nutr* (2021) 8:717925. doi: 10.3389/fnut.2021.717925
51. Ferjani H, El Abassi H, Ben Salem I, Guedri Y, Abid S, Achour A, et al. The Evaluate and Compare the Effects of the Tacrolimus and Sirolimus on the Intestinal System Using an Intestinal Cell Culture Model. *Toxicol Mech Methods* (2016) 26(1):54–60. doi: 10.3109/15376516.2015.1090514
52. Duncan MD, Wilkes DS. Transplant-Related Immunosuppression: A Review of Immunosuppression and Pulmonary Infections. *Proc Am Thorac Soc* (2005) 2(5):449–55. doi: 10.1513/pats.200507-073JS
53. Paudel S, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Ziakas PD, Mylonakis E. Prevalence of Clostridium Difficile Infection Among Solid Organ Transplant Recipients: A Meta-Analysis of Published Studies. *PLoS One* (2015) 10(4):e0124483. doi: 10.1371/journal.pone.0124483
54. Antharam VC, Li EC, Ishmael A, Sharma A, Mai V, Rand KH, et al. Intestinal Dysbiosis and Depletion of Butyrogenic Bacteria in Clostridium Difficile Infection and Nosocomial Diarrhea. *J Clin Microbiol* (2013) 51(9):2884–92. doi: 10.1128/JCM.00845-13
55. Yeoh YK, Zuo T, Lui GCY, Zhang F, Liu Q, Li AY, et al. Gut Microbiota Composition Reflects Disease Severity and Dysfunctional Immune Responses in Patients With COVID-19. *Gut* (2021) 70(4):698–706. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323020
56. Tang L, Gu S, Gong Y, Li B, Lu H, Li Q, et al. Clinical Significance of the Correlation Between Changes in the Major Intestinal Bacteria Species and COVID-19 Severity. *Eng Beijing China* (2020) 6(10):1178–84. doi: 10.1016/j.jeng.2020.05.013
57. Santos Rocha C, Hirao LA, Weber MG, Méndez-Lagares G, Chang WLW, Jiang G, et al. Subclinical Cytomegalovirus Infection Is Associated With Altered Host Immunity, Gut Microbiota, and Vaccine Responses. *J Virol* (2018) 92(13):e00167–18. doi: 10.1128/JVI.00167-18
58. Bhat M, Usmani SE, Azhie A, Woo M. Metabolic Consequences of Solid Organ Transplantation. *Endocr Rev* (2021) 42(2):171–97. doi: 10.1210/endo/bnaa030
59. Becchetti C, Dirchwolf M, Banz V, Dufour JF. Medical Management of Metabolic and Cardiovascular Complications After Liver Transplantation. *World J Gastroenterol* (2020) 26(18):2138–54. doi: 10.3748/wjg.v26.i18.2138
60. Cohen E, Korah M, Callender G, Belford de Aguiar R, Haakinson D. Metabolic Disorders With Kidney Transplant. *Clin J Am Soc Nephrol* (2020) 15(5):732–42. doi: 10.2215/CJN.09310819
61. Ward HJ. Nutritional and Metabolic Issues in Solid Organ Transplantation: Targets for Future Research. *J Ren Nutr* (2009) 19(1):111–22. doi: 10.1053/j.jrn.2008.10.020
62. Shen F, Zheng RD, Sun XQ, Ding WJ, Wang XY, Fan JG. Gut Microbiota Dysbiosis in Patients With non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int HBPD Int* (2017) 16(4):375–81. doi: 10.1016/S1499-3872(17)60019-5
63. Da Silva HE, Teterina A, Comelli EM, Taibi A, Arendt BM, Fischer SE, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease is Associated With Dysbiosis Independent of Body Mass Index and Insulin Resistance. *Sci Rep* (2018) 8(1):1466. doi: 10.1038/s41598-018-19753-9
64. McPartland KJ, Pomposelli JJ. Update on Immunosuppressive Drugs Used in Solid-Organ Transplantation and Their Nutrition Implications. *Nutr Clin Pract* (2007) 22(5):467–73. doi: 10.1177/0115426507022005467
65. Pischon T, Sharma AM. Obesity as a Risk Factor in Renal Transplant Patients. *Nephrol Dial Transplant* (2001) 16(1):14–7. doi: 10.1093/ndt/16.1.14
66. Martins C, Pecoits-Filho R, Riella MC. Nutrition for the Post-Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* (2004) 36(6):1650–4. doi: 10.1016/j.transproceed.2004.06.065
67. Bernardi A, Biasia F, Pati T, Piva M, Scaramuzza P, Stoppa F, et al. Factors Affecting Nutritional Status, Response to Exercise, and Progression of Chronic

- Rejection in Kidney Transplant Recipients. *J Ren Nutr* (2005) 15(1):54–7. doi: 10.1053/j.jrn.2004.09.039
68. Moreira APB, Teixeira TFS, Ferreira AB, Peluzio M do CG, Alfenas R de CG. Influence of a High-Fat Diet on Gut Microbiota, Intestinal Permeability and Metabolic Endotoxaemia. *Br J Nutr* (2012) 108(5):801–9. doi: 10.1017/S0007114512001213
69. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JL. Obesity Alters Gut Microbial Ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(31):11070–5. doi: 10.1073/pnas.0504978102
70. Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The Human Gut Microbiota: Metabolism and Perspective in Obesity. *Gut Microbes* (2018) 9(4):308–25. doi: 10.1080/19490976.2018.1465157
71. Alagiakrishnan K, Halverson T. Holistic Perspective of the Role of Gut Microbes in Diabetes Mellitus and its Management. *World J Diabetes* (2021) 12(9):1463–78. doi: 10.4239/wjdv12.9.1463
72. Zhao L, Lou H, Peng Y, Chen S, Zhang Y, Li X. Comprehensive Relationships Between Gut Microbiome and Faecal Metabolome in Individuals With Type 2 Diabetes and its Complications. *Endocrine* (2019) 66(3):526–37. doi: 10.1007/s12020-019-02103-8
73. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and Diabetes: An Evolving Relationship. *Gut* (2014) 63(9):1513–21. doi: 10.1136/gutjnl-2014-306928
74. Kraukramer KA, Fan J, Bäckhed F. Gut Microbial Metabolites as Multi-Kingdom Intermediates. *Nat Rev Microbiol* (2021) 19(2):77–94. doi: 10.1038/s41579-020-0438-4
75. van der Hee B, Wells JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-Chain Fatty Acids. *Trends Microbiol* (2021) 29:S0966842X21000354. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.001
76. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beaufils F, Wieërs G, Guery B, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol* (2020) 10:9. doi: 10.3389/fcimb.2020.00009
77. Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology. *Front Immunol* (2020) 11:604179. doi: 10.3389/fimmu.2020.604179
78. Bik EM, Ugalde JA, Cousins J, Goddard AD, Richman J, Apte ZS. Microbial Biotransformations in the Human Distal Gut. *Br J Pharmacol* (2018) 175(24):4404–14. doi: 10.1111/bph.14085
79. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* (2013) 341(6145):569–73. doi: 10.1126/science.1241165
80. Saad MJA, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiol Bethesda Md* (2016) 31(4):283–93. doi: 10.1152/physiol.00041.2015
81. Adachi K, Sugiyama T, Yamaguchi Y, Tamura Y, Izawa S, Hijikata Y, et al. Gut Microbiota Disorders Cause Type 2 Diabetes Mellitus and Homeostatic Disturbances in Gut-Related Metabolism in Japanese Subjects. *J Clin Biochem Nutr* (2019) 64(3):231–8. doi: 10.3164/jcfn.18-101
82. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes. *Nature* (2012) 490(7418):55–60. doi: 10.1038/nature11450
83. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut Metagenome in European Women With Normal, Impaired and Diabetic Glucose Control. *Nature* (2013) 498(7452):99–103. doi: 10.1038/nature12198
84. Allin KH, Nielsen T, Pedersen O. Mechanisms in Endocrinology: Gut Microbiota in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Eur J Endocrinol* (2015) 172(4):R167–177. doi: 10.1530/EJE-14-0874
85. Yadav H, Lee JH, Lloyd J, Walter P, Rane SG. Beneficial Metabolic Effects of a Probiotic via Butyrate-Induced GLP-1 Hormone Secretion. *J Biol Chem* (2013) 288(35):25088–97. doi: 10.1074/jbc.M113.452516
86. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes* (2009) 58(7):1509–17. doi: 10.2337/db08-1637
87. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive Effect of Short-Chain Fatty Acids on Production of Proinflammatory Mediators by Neutrophils. *J Nutr Biochem* (2011) 22(9):849–55. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.009
88. Hu S, Kuwabara R, de Haan BJ, Smink AM, de Vos P. Acetate and Butyrate Improve  $\beta$ -Cell Metabolism and Mitochondrial Respiration Under Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* (2020) 21(4):E1542. doi: 10.3390/ijms21041542
89. Kim YA, Keogh JB, Clifton PM. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Insulin Sensitivity. *Nutr Res Rev* (2018) 31(1):35–51. doi: 10.1017/S095442241700018X
90. Blaak EE, Canfora EE, Theis S, Frost G, Groen AK, Mithieux G, et al. Short Chain Fatty Acids in Human Gut and Metabolic Health. *Benef Microbes* (2020) 11(5):411–55. doi: 10.3920/BM2020.0057

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

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

Copyright © 2022 Faucher, Jardou, Brossier, Picard, Marquet and Lawson. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## Supportive therapy during COVID-19: The proposed mechanism of short-chain fatty acids to prevent cytokine storm and multi-organ failure

M. Jardou, R. Lawson\*

INSERM, Univ. Limoges, Pharmacology & Transplantation, U1248, F-87000 Limoges, France

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 COVID-19  
 Cytokine storm  
 Multi-organ failure  
 Intestinal dysbiosis  
 Short-chain fatty acids  
 Butyrate

### ABSTRACT

The world is currently facing the COVID-19 pandemic that is taking a heavy toll on several countries. While many infected patients have a good prognosis, in some cases the progression can be serious and even lead to death. The commonly seen complications are a cytokine storm and multi-organ failure that require intensive care. The mortality of critically ill patients depends on age, sex, immune state or co-morbidities. There is an urgent need to discover a biomarker to identify early on patients at risk of developing serious complications and to find an effective treatment that could prevent disease progression and critical states. Recent investigations have pointed to the possible contribution of intestinal dysbiosis to the pathophysiology of COVID-19. Herein, we hypothesize that butyrate, a short-chain fatty acid initially produced by the gut microbiota, could be administered as supportive therapy to prevent immune system activation and disease progression.

### Background

The coronavirus disease (COVID-19) pandemic for which the first case was reported in December 2019 in Wuhan (China), is a highly contagious and life-threatening viral infection. For the period from December 2019 to June 2021, it has already affected more than 176 million people and caused more than 3.8 million deaths worldwide according to the World Health Organization [1].

### Clinical presentation

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) which is responsible for COVID-19 is a new member of the *Coronaviridae* family. Transmission mostly occurs via respiratory droplets and aerosols from person-to-person. Once in the respiratory tract, the virus attaches to its specific receptor site, the angiotensin I converting enzyme 2 (ACE-2) and its entry into cells then requires transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) expressed by pulmonary epithelial cells. The virus penetrates host cells for replication followed by viral particles assembling and release of the new virions [2].

The clinical spectrum of COVID-19 ranges from asymptomatic, moderate, severe illnesses, up to critical states. The most frequent symptoms are fever, dry cough, dyspnea and fatigue that can be

associated to myalgia, rhinorrhea, vomiting and cephalgia. Most of the infected patients have a good prognosis but in some cases, progression can become severe, possibly leading to death. The commonly seen complications in critically ill patients are acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis, disseminated intravascular coagulation, acute liver or kidney injuries and pulmonary embolism. In rare cases, multi-system inflammatory syndrome, rhabdomyolysis, autoimmune hemolytic anemia and neurological complications have been observed [3,4]. The mortality of critically ill patients depends on age (more than 65 years old), sex (male), co-morbidities (e.g., metabolic syndrome, diabetes, cerebrovascular, cardiac or pulmonary diseases) and immune state [5,6]. Furthermore, SARS-CoV-2 associated risk is increased with respect to seasonal influenza since its transmission rate is nearly three times higher [7,8]. Fortunately, influenza vaccine is associated with a better clinical outcomes and presents no harmful effect on COVID-19 susceptibility [9].

Severe prognosis is correlated to the so-called “cytokine storm” which is frequently observed in critically ill patients. Such an event is defined by a huge increase of pro-inflammatory cytokines (namely interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, interferon (IFN)- $\alpha/\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ) and chemokines (namely C-C motif chemokine ligand (CCL)2, CCL3, CCL5). A well-coordinated innate immune response is the first line of defense against pathogens and plays a crucial role in the

\* Corresponding author at: Centre de Biologie et Recherche en Santé (CBRS), Faculty of Pharmacy, University of Limoges, 2, av. Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France.

E-mail address: [roland.lawson@unilim.fr](mailto:roland.lawson@unilim.fr) (R. Lawson).

<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110661>

Received 12 February 2021; Received in revised form 23 July 2021; Accepted 25 July 2021

Available online 5 August 2021

0306-9877/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

prevention of SARS-CoV-2 spreading [10]. However, dysregulated and/or excessive immune responses have been shown to fail at clearing the virus and in turn, can even contribute to the pathogenesis of ARDS as well as multi-organ failure [3]. The excessive production of cytokines results in tissular infiltration of inflammatory cells (e.g., macrophages and neutrophils); which favors (i) the alteration of the alveolar-capillary barrier, (ii) lung tissue damage (vascular leakage, alveolar oedema) and (iii) hypoxia associated with ARDS [11]. The cytokine storm also plays a central role in extrapulmonary multi-organ failure (heart, kidney and liver) [12]. Moreover, decrease in natural killer (NK) and T cell populations ascribed to lymphocytopenia have been also observed and correlated to disease severity [13,14]. The cytokine storm promotes tissue homing of immune cells and thrombosis. Moreover, a post-COVID syndrome leading to lymphocytopenia has been also observed and immunologic aberrations and inflammatory damages. This syndrome encompasses a spectrum of pulmonary, hematologic, cardiovascular, neuropsychiatric, renal, endocrine, dermatologic and gastrointestinal injuries.

#### Current pharmacological treatment of the cytokine storm

Since the beginning of the pandemic, many antiviral agents have been used or are still under clinical evaluation for COVID-19 (e.g., lopinavir-ritonavir or darunavir-cobicistat combinations, remdesivir, favipiravir, camostat mesylate-nafamostat) [15]. However, once immunologic complications occur, the use of standalone antiviral treatment is not sufficient. It should be combined with anti-inflammatory treatments to manage the cytokine storm as well as anti-coagulative drugs. Regarding the cytokine storm mechanism, the current therapeutic approaches consist in: (i) supplementing with IFN- $\lambda$  to potentiate innate immunity, (ii) using immunomodulators (e.g., corticosteroids, intravenous immunoglobulins) to restore immune balance, (iii) inhibiting cytokine productions (e.g., IL-1 or IL-6 antagonists, TNF blockers, IFN- $\alpha/\beta$  inhibitors, ulinastatin, oxidase phospholipids, sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonists and stem cell therapy), (iv) scavenging cytokines (hemofiltration), (v) inhibiting mononuclear macrophage recruitment and action (toll-like receptor (TLR) 7 antagonist and C-C motif chemokine receptor type (CCR) 2 blockers), and/or (vi) strengthening the vascular barrier by activating the endothelial Slit-Robot4 signal pathway [12,15,16].

The period of treatment administration for SARS-CoV-2 is crucial. Indeed, an early exposure of the aforementioned strategies may inhibit the onset of the host's immune response, for example if drugs are administered too early. However, the best strategy is to act before the production of pro-inflammatory cytokines. For instance, montelukast commonly used in the treatment of persistent asthma has recently been proposed for COVID-19 treatment in an intensive care unit [17]. Montelukast can inhibit cytokine production through the inhibition of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signaling pathway, which down-regulates pro-inflammatory mediators. This approach seems promising since the blockade of cytokine production might be efficient in preventing pro-inflammatory consequences.

#### The hypothesis

In the present article, we aim to propose a new strategy dedicated to block the immune system overactivation. It is worth mentioning that after virus recognition, macrophages polarize towards the pro-inflammatory M1 phenotype. M1 macrophages actively produce pro-inflammatory cytokines which in turn drive viral replication and facilitate spreading of pathogens in the patient and tissue damage [18]. Therefore, a very promising therapeutic alternative could be to modulate the differentiation of macrophages in order to orient them towards the anti-inflammatory M2 phenotype.

#### Indirect proof of macrophages M1/M2 ratio skewing in critically ill COVID-19 patients

Macrophages are major regulators of inflammatory response and also play a central role in host defense [19]. They are featured by an important cell heterogeneity and plasticity. Indeed, in reaction to microenvironmental stimuli, macrophages can adopt different functional programs. Macrophages can either differentiate through a pro-inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) phenotype [18]. M1 macrophage polarization is mediated by IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  or lipopolysaccharides stimulation. M1 transformation hallmarks are both the inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL8 production. This leads to pathogens destruction for which the time-window of inflammatory processes usually ranges from hours to days, but it has been shown that it can last for months or years, resulting in non-resolving inflammation. On the other hand, M2 macrophage polarization involves other interleukins stimulation (namely IL-4 and IL-13) and promotes up-regulation of genes associated to tissue repair and remodeling (e.g., *arginase 1 (arg1)*) [18]. M2 macrophages exert their anti-inflammatory response via some specific cytokines like IL-1, IL-13, tumor growth factor (TGF)- $\beta$  and chemokines CCL1, CCL2, CCL13 [18]. Therefore, M1 and M2 macrophages can easily be distinguished by their cytokine profiles as well as the expression of cell surface markers.

M1/M2 macrophages balance is finely regulated by specific signaling pathways. NF- $\kappa$ B and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 signaling pathways lead to M1 phenotype, while STAT3, STAT6 and PPAR $\gamma$  signaling pathways favor the M2 phenotype [19]. An imbalance between these two phenotypes has been already observed in chronic inflammatory diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease or atherosclerosis [20,21].

According to cytokines and chemokines profiles at the systemic level of critically ill patients (e.g., IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  and CCL5), it has been suggested that macrophages involved in the cytokine storm have the pro-inflammatory M1 phenotype [22]. However, such an observation still needs to be validated in clinical samples.

#### Intestinal dysbiosis, macrophages polarization and arguments for supportive therapy with short-chain fatty acids

Clinical characteristics of patients who develop severe forms of COVID-19 consistently suggest the contribution of intestinal dysbiosis. These patients are those with specific risk factors in relation to unhealthy gut microbiome status [23]. Moreover, COVID-19 infection itself is associated to the alteration of the gut microbiome characterized by an enrichment of opportunistic organisms and depletion of beneficial commensals [24,25]. Therefore, there is a link between gut microbiota alterations and the pathophysiology of COVID-19. Maintaining a healthy microbiome status is a possible strategy to tame COVID-19 severity. Gut microbiota is known as a key factor of host immune system homeostasis and its composition has been found depleted with bacteria associated to immunomodulatory effects in some COVID-19 patients [24]. Furthermore, intestinal dysbiosis has been linked to the decrease of main pro-resolving mediators. *Faecalibacterium prausnitzii*, a butyrate-producing bacteria, has been found depleted in critically ill patients [26]. This has also been associated to a pro-inflammatory state featured by (i) a decrease of regulatory T cells and (ii) polarization of macrophages into the M1 phenotype [27].

Short-chain fatty acids (SCFAs) belong to the pro-resolving mediators that participate in the dynamic host-microbiome network to regulate immune response. SCFAs are produced by the gut microbiota from the anaerobic fermentation of indigestible polysaccharides such as dietary fibers and resistant starches. Acetate, propionate and butyrate are key since they ensure the communication between the host and the microbiome, playing an important role in host homeostasis [28]. SCFAs

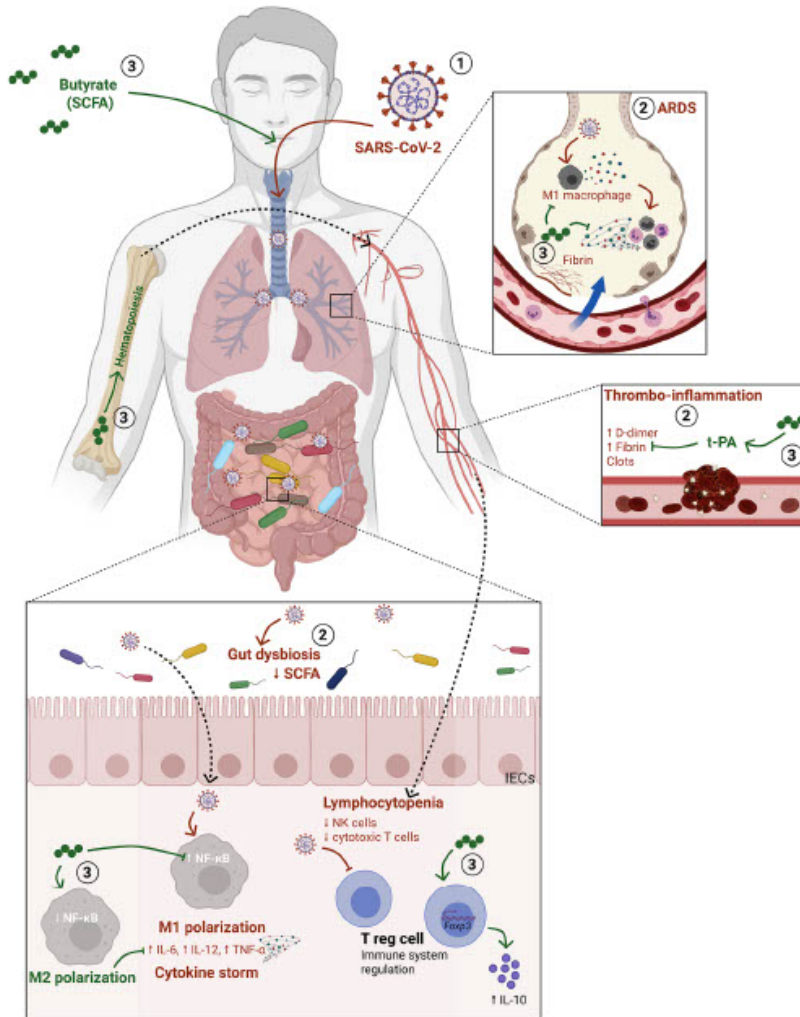


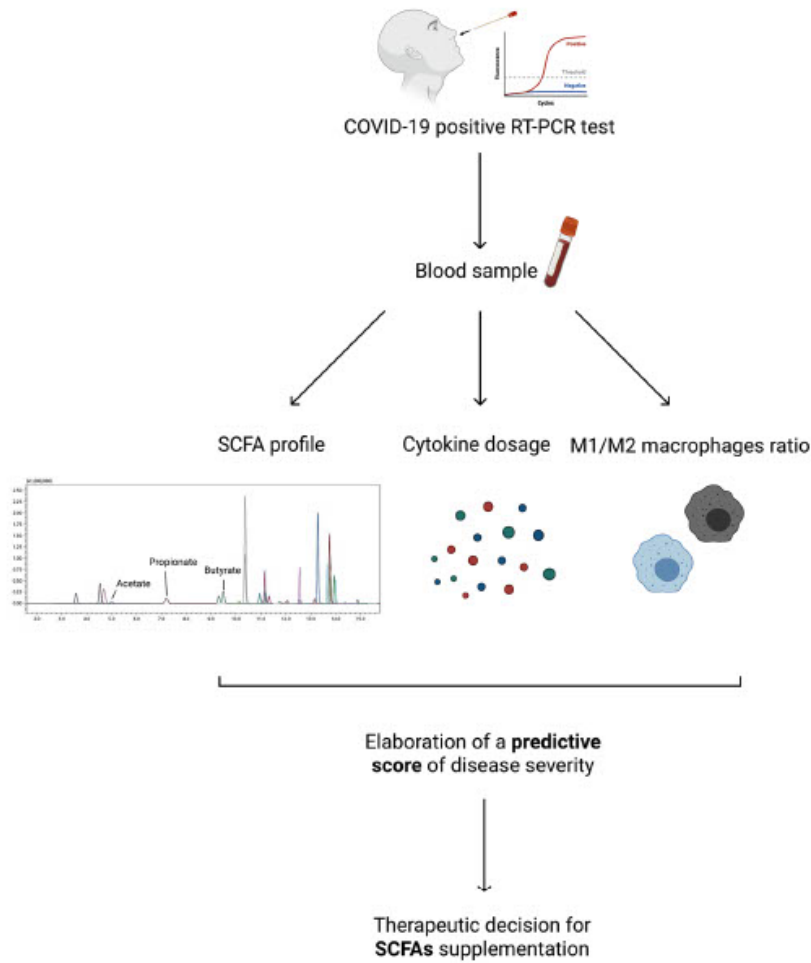
Fig. 1. The proposed mechanism of short-chain fatty acids to prevent cytokine storm and multi-organ failure. (1) SARS-CoV-2 enters and colonizes the host organism mainly through the airways. (2) Intestinal dysbiosis is found in patients with severe forms of COVID-19. Lymphocytopenia is also observed and SARS-CoV-2 inhibits regulatory T cells and leads to activation of the NF- $\kappa$ B signalling pathway which promotes the cytokine storm. (3) Supplementation with butyrate could help to limit the cytokine storm through the inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway and promotion of anti-inflammatory M2 macrophages. Moreover, butyrate could restrain the thrombo-inflammation phenomenon by activating the t-PA. Created with Bio-render.com.

can act on various immune cells in the gut to inhibit inflammation through multiple mechanisms. For instance, they modulate the differentiation of regulatory T cells or inhibit histone deacetylase (HDAC). They can also specifically activate some G protein-coupled receptors (GPCRs, e.g., FFAR2, FFAR3) in order to enhance the intestinal barrier function and to modulate the immune system. Moreover, butyrate mainly triggers the metabolic shift in macrophages towards anti-inflammatory M2 phenotype *via* the inhibition of HDAC3 [28]. In other words, SCFAs may provide a better control of the inflammatory response, suggesting that their therapeutic properties are worth exploring.

**Focus on the systemic anti-inflammatory effects of butyrate**

SCFAs are first absorbed by intestinal epithelial cells and are then metabolized in the liver. Only a small fraction reaches the systemic circulation. However, it has been suggested that systemic SCFAs are

protective against allergic asthma [29]. Butyrate can inhibit adhesion of eosinophils to the endothelium and is known to improve allergen-induced inflammation in mice [29]. Moreover, HDAC inhibitors are protective against vascular inflammation and atherosclerosis by modulating the endothelial function and production of pro-inflammatory cytokines, particularly with butyrate. SCFAs also improve kidney function after acute kidney injury induced by ischemia–reperfusion [28]. Butyrate has been thoroughly evaluated as HDAC inhibitor and pointed as the most pharmacologically active of SCFA [30]. HDAC inhibition by butyrate promotes the inhibition of lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide (*via* iNOS) and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-12) release [30]. More interestingly, butyrate has shown inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway and facilitates the expression of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 in mononuclear cells and neutrophils [31]. Recently, it has been shown in gut epithelial organoids and in some gastric cells lines that butyrate can downregulate genes essential for SARS-CoV-2 infection (*Ace2*, *Tmprss2*) and can also



**Fig. 2.** Path for the decision of supportive therapy with SCFA. From the blood sample of a person tested positive for COVID-19, we propose to perform plasma SCFA profiling, relevant cytokine dosage and M1/M2 macrophages ratio at early stages of the disease. These data will serve as inputs to build a predictive score of disease severity or progression and to decide SCFAs supplementation.

upregulated other antiviral pathways [32,33]. Altogether, all these studies provide strong evidence that SCFA and especially butyrate exhibit a worth-investigating anti-inflammatory action that might be used to prevent or alter the course of cytokine storm in critically ill COVID-19 patients.

*Butyrate supplementation for preventing the cytokine storm*

Similar to the observations made on experimental models of viral infection (e.g., Influenza A), we propose that the inflammatory response during COVID-19 involves an increased M1/M2 macrophage phenotype ratio [34]. The M1 phenotype is likely to be associated to the activation of the NF- $\kappa$ B pathway and the pro-inflammatory cytokine production (e.g., IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ). This could at least partially explain the observed excessive cytokine release. Therefore, a relevant alternative is to restore the M1/M2 balance ratio by favoring M2 macrophage differentiation. Butyrate supplementation is expected to help polarize macrophages into

M2 phenotype, which in turn might decrease pro-inflammatory cytokine production. Butyrate is proposed to inhibit the NF- $\kappa$ B pathway by preventing proteasomal degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor, namely I $\kappa$ B. Ji et al. elegantly demonstrated that butyrate facilitates M2 macrophage polarization by HDAC inhibition and STAT6 signaling pathway activation. Furthermore, they observed an upregulation of M2 markers such as *arg1* and *found in inflammatory zone 1 (fizz1)* [35]. Furthermore, butyrate is known to prevent excessive neutrophil recruitment into the airways via a GPCR-dependent receptor and by an alteration of the CXCL1 synthesis, which is a neutrophil chemoattractant produced by macrophages [34]. In other words, butyrate supplementation could also limit inflammatory cell infiltration in the airways, which in turn might reduce tissue and vascular disruption. In addition, butyrate also stimulates hematopoiesis by favoring the development of macrophage progenitors with the M2 phenotype [36]. Through the expression of the transcription factor *forkhead box protein P3 (foxp3)* butyrate also promotes regulatory T cells, which modulate the immune system and secrete anti-

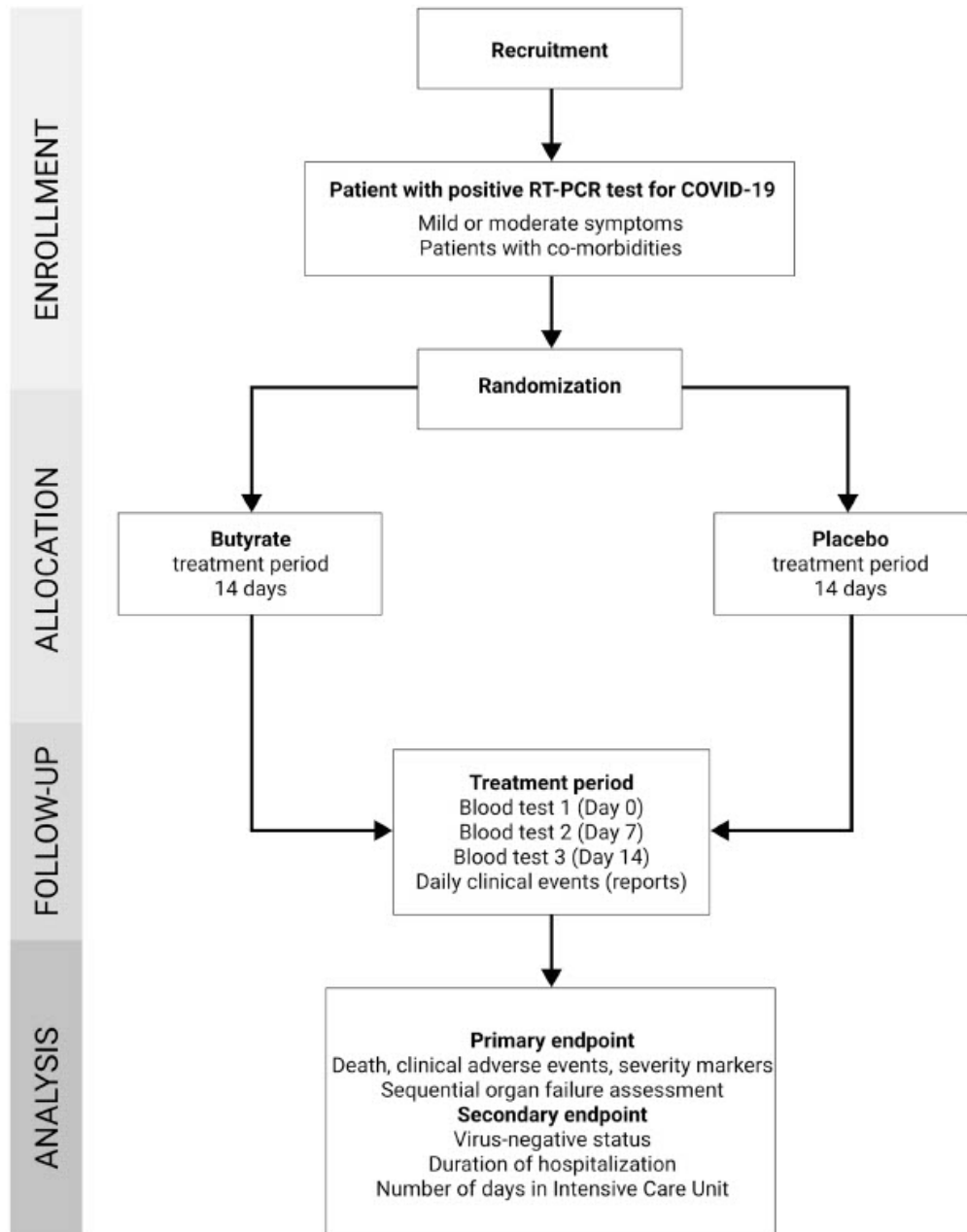


Fig. 8. Flowchart of the proposed clinical trial. This clinical trial will enrol patients positive for COVID-19 (RT-PCR test) at mild to moderate stage who have co-morbidities. After randomization, blood samples will be collected at different endpoints for SCFA profile and cytokine dosage. The primary endpoint could combine clinical adverse events, disease severity markers, sequential organ failure assessment, the need and duration of hospitalization, time until virus negatvation or death due to SARS-CoV-2 infection.



inflammatory cytokines (IL-10). Butyrate is also known to limit the thrombo-inflammation phenomenon by activating the tissue-plasminogen activator (t-PA), thus likely to play a role in anti-coagulation COVID-19 strategies (Fig. 1).

#### Evaluation of the hypothesis

##### Supportive therapeutic strategy with SCFA

The cytokine storm plays a critical role in COVID-19 pathophysiology depending on macrophage activation. Supplementation with SCFAs and especially butyrate could help to modulate the immune system activation early on. Our idea is to systematically associate SCFAs serum profiling, cytokine dosage and/or M1/M2 macrophages ratio determination in each patient positive for COVID-19 at the early stages of the disease. In face of the absence of validated borderlines of these tests in specific cohort of COVID-19 patients, investigations will be performed according to limits routinely applied for other pathologies. This might help to detect intestinal dysbiosis and identify patients at risk of developing severe immune complications that could benefit from this supportive therapy. In addition to clinical characteristics, these parameters could also serve to elaborate a strong predictive score of COVID-19 progression and to initiate early butyrate supplementation as a supportive treatment in such detected vulnerable patients (Fig. 2).

##### Preclinical proof-of-concept of butyrate as supportive therapy

Recently, butyrate treatment shows beneficial effects in influenza-induced mice by preventing excessive neutrophil recruitment into the airways [34]. These results have driven the hypothesis that butyrate could serve as a supportive therapy during COVID-19 infection. Pre-clinical investigations performed with gut epithelial organoids or gastric cell lines have shown down-regulation of SARS-CoV-2 entry genes under butyrate treatment [32,33]. Another level of proof-of-concept could be reached by investigating the effects of butyrate supplementation in a relevant mouse model of SARS-CoV-2 infection. This could be achieved with mice expressing human ACE2 enzyme, inoculated with SARS-CoV-2 that develop ARDS within five days [37].

##### Clinical trial design

Our hypothesis could be tested through a randomized double-blind prospective trial. This trial would enroll patients tested positive for SARS-CoV-2 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and who are at risk of progressing to severe COVID-19 (older patients with confirmed co-morbidities like heart disease, hypertension, chronic respiratory disease, obesity, diabetes). After signing the informed consent, patients would be randomized to either "butyrate" or "placebo" groups. Patients would be proposed either butyrate capsules or placebo on a daily basis and for a fortnight. A remote telehealth monitoring service for clinical events would be performed from diagnosis to the final outcome. This would include the use of validated specific and general health questionnaires to document disease progression. Blood samples would be collected before treatment initiation and at 7 and 14 days after, for SCFA profiles and cytokine dosage. The primary endpoint could be a combined score aggregating clinical adverse events, severity markers, sequential organ failure assessment, the need and duration of hospitalization, time until virus negativation or death due to SARS-CoV-2 infection (Fig. 3).

#### Conclusion

The cytokine storm acts as a critical factor in the occurrence of severe-to-death patients with COVID-19. This event is mostly defined by the unbalanced increase of circulating pro-inflammatory cytokines, which in turn may lead to multi-organ failure. To counterpoise this

phenomenon, we propose an early identification of patients at risk by investigating macrophages polarization. The decision to supplement with butyrate will be made on the basis of SCFA profiles, cytokine dosage and M1/M2 macrophage ratio. SCFAs and mainly butyrate can be considered as pro-resolving mediators due to their already known role in the immune response modulation. It is important to note that pro-resolving mediators have the major advantage of not blocking the initial immune response but rather downregulating the process to resolve inflammation, which is crucial during COVID-19.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

We would like to acknowledge Ms. Karen Poole for manuscript editing and all the INSERM U1248 members for their valuable inputs and discussions during the preparation of this manuscript.

##### Funding source.

The authors received no specific funding for this work.

#### Consent statement/Ethical approval

Not required.

#### References

- [1] WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://covid19.who.int/>.
- [2] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020;181(2):271–280.e8.
- [3] Grasselli G, Tonetti T, Protti A, Langer T, Girardis M, Bellani G, et al. Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: a multicentre prospective observational study. *Lancet Respir Med* 2020;8(12):1201–8.
- [4] Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. *Postgrad Med J* 2021;97(1147):312–20.
- [5] McGurnaghan SJ, Weir A, Bishop J, Kennedy S, Blackburn LAK, McAllister DA, et al. Risk of and risk factors for COVID-19 disease in people with diabetes: a cohort study of the total population of Scotland. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2021;9(2):82–93.
- [6] Alizadehsani R, Alizadeh Sani Z, Behjati M, Roshanzamir Z, Husain S, Abedini N, et al. Risk factors prediction, clinical outcomes, and mortality in COVID-19 patients. *J Med Virol* 2021;93(4):2307–20.
- [7] Piroth L, Cottene J, Mariet A-S, Bonniaud P, Biot M, Tubert-Bitter P, et al. Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2021;9(3):251–9.
- [8] Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* 2020;8(5):475–81.
- [9] Conlon A, Ashur C, Washer L, Eagle KA, Hofmann Bowman MA. Impact of the influenza vaccine on COVID-19 infection rates and severity. *Am J Infect Control* 2021;49(6):694–700.
- [10] Catanzaro M, Pagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni C. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020.
- [11] Rendeiro AP, Ravichandran H, Bram Y, Chandar V, Kim J, Meydan C, et al. The spatial landscape of lung pathology during COVID-19 progression Pathophysiology of lungs in patients with COVID-19. *Nature* 2021;593(7860):564–9.
- [12] Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the "Cytokine Storm" in COVID-19. *J Infect* 2020;80(6):607–13.
- [13] Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (80-)*. 2020 Aug 7;369(6504):718–24.
- [14] Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* 2020;383(2):120–8.

- [15] Scavone C, Brusco S, Bertini M, Sportiello L, Rafaniello C, Zoccoli A, et al. Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next? *Br J Pharmacol* 2020;177(21):4813–24.
- [16] Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol* 2020;39(7):2085–94.
- [17] Sanghai N, Tranmer GK. Taming the cytokine storm: repurposing montelukast for the attenuation and prophylaxis of severe COVID-19 symptoms. *Drug Discov Today*. 2020;25(12):2076–9.
- [18] Atri C, Guerfali F, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci* 2018;19(6):1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.
- [19] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787–95.
- [20] Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F, Yao Y-M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*. 2014;10(5):520–9.
- [21] Girodet P-O, Nguyen D, Mancini JD, Hundal M, Zhou X, Israel E, et al. Alternative macrophage activation is increased in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016;55(4):467–75.
- [22] Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2020;20(6):355–62.
- [23] Donati Zeppa S, Agoitini D, Piccoli G, Stocchi V, Sestili P. Gut Microbiota Status in COVID-19: An Unrecognized Player? Vol. 10, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 742.
- [24] Yeoh YK, Zuo T, Lui G-Y, Zhang F, Liu Q, Li AYL, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut* 2021;70(4):698–706.
- [25] Tang L, Gu S, Gong Y, Li Bo, Lu H, Li Q, et al. Clinical Significance of the Correlation between Changes in the Major Intestinal Bacteria Species and COVID-19 Severity. *Engineering*. 2020;6(10):1178–84.
- [26] Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nature Med Nature Res* 2021;27(4):601–15.
- [27] Sousa LP, Pinho V, Teixeira MM. Harnessing inflammation resolving-based therapeutic agents to treat pulmonary viral infections: what can the future offer to COVID-19? *Br J Pharmacol* 2020;177(17):3898–904.
- [28] Zhang Z, Tang H, Chen P, Xie H, Tao Y. Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4(1):1–34.
- [29] Theiler A, Bärnthal T, Platzer W, Richtig G, Peinhaupt M, Rittchen S, et al. Butyrate ameliorates allergic airway inflammation by limiting eosinophil trafficking and survival. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144(3):764–76.
- [30] He J, Zhang P, Shen L, Niu L, Tan Ya, Chen L, et al. Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism. *Int J Mol Sci* 2020;21(17):6356. <https://doi.org/10.3390/ijms21176356>.
- [31] Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(6):2247–52.
- [32] Li J, Richards EM, Handberg EM, Pepine CJ, Raizada MK. Butyrate regulates COVID-19-relevant genes in gut epithelial organoids from normotensive rats. *Hypertension* 2021;77(2). <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16647>.
- [33] Takahashi Y, Hayakawa A, Sano R, Fukuda H, Harada M, Kubo R, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress ACE2 and ABO simultaneously, suggesting a preventive potential against COVID-19. *Sci Rep* 2021;11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82970-2>.
- [34] Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, Lopez-Mejia IC, Riva E, Pernot J, et al. Dietary fiber confers protection against flu by shaping Ly6c<sup>+</sup> patrolling monocyte hematopoiesis and CD8<sup>+</sup> T cell metabolism. *Immunity* 2018;48(5):992–1005.e8.
- [35] Ji J, Shu D, Zheng M, Wang J, Luo C, Wang Y, et al. Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. *Sci Rep* 2016;6(1). <https://doi.org/10.1038/srep24838>.
- [36] Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. *Mucosal Immunol* 2019;12(4):843–50.
- [37] Hong W, Yang J, Bi Z, He C, Lei H, Yu W, et al. A mouse model for SARS-CoV-2-induced acute respiratory distress syndrome. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00451-w>.

## Rôle du co-métabolome intestinal en transplantation : contribution des acides gras à chaîne courte à l'homéostasie digestive et à l'immunomodulation

La transplantation d'organe est proposée aux patients pour la prise en charge de certaines pathologies terminales. Les traitements immunosuppresseurs sont actuellement l'un des piliers de la prise en charge des transplantés. Cependant, cette prise en charge tout au long de la vie d'un patient transplanté peut être à l'origine d'une iatrogénie médicamenteuse. De récentes avancées dans l'étude du microbiote digestif soulignent le rôle fondamental de ce microbiote dans l'homéostasie du tube digestif, souvent altérée par certains immunosuppresseurs ainsi que dans la régulation du système immunitaire. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact des altérations du microbiote digestif en période post-transplantation sur la réponse aux immunosuppresseurs. Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'intégrité de la barrière intestinale lors d'un traitement immunosuppresseur. Ces résultats nous ont permis de proposer un score de gravité de cette perméabilité qui combine le dosage des lipopolysaccharides avec le dosage plasmatique des acides gras à chaîne courte (SCFA) qui sont des métabolites majoritairement issus du microbiote. Ces travaux rapportent pour la première fois l'existence d'une perméabilité intestinale chez les patients transplantés. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé les altérations fonctionnelles du microbiote digestif pouvant expliquer cette perte d'intégrité de la barrière intestinale et évalué une stratégie thérapeutique. Nous avons montré, à l'aide d'un modèle d'entéropathie liée à l'acide mycophénolique à différents stades de gravité (modéré et sévère), une altération fonctionnelle du microbiote caractérisée par la diminution de la production des SCFA et une altération des jonctions serrées entre les cellules épithéliales au niveau du côlon. La supplémentation en SCFA dans ce modèle d'entéropathie modéré corrige la perte d'expression des protéines de jonction. Au cours de ces travaux, nous avons également développé, validé et standardisé un modèle préclinique de greffe allogénique de peau chez la souris. Ce modèle servira à explorer l'impact d'une supplémentation en acide gras à chaîne courte sur le devenir du greffon.

*Mots-clés* : transplantation, immunosuppresseurs, iatrogénie médicamenteuse, microbiote digestif, métabolome

## Intestinal co-metabolome in transplantation: contribution of short-chain fatty acids to digestive homeostasis and immunomodulation

Organ transplantation is offered to patients for the treatment of some terminal pathologies. Immunosuppressive treatments are currently one of the mainstays of transplant management. However, this lifelong management of transplant patients can give rise to drug-related iatrogenesis. Recent advances in the study of the intestinal microbiota highlight the fundamental role of this microbiota in the homeostasis of the digestive tract, often the target of certain immunosuppressants, and in the regulation of the immune system. In this thesis, we investigated the impact of alterations in the intestinal microbiota in the post-transplant period on the response to immunosuppressants. We started by studying the integrity of the intestinal barrier during immunosuppressive treatment. These results lead to the development of a severity score for this permeability that combines the lipopolysaccharide assay with the plasma assay for short-chain fatty acids (SCFA), which are metabolites mainly produced by the microbiota. This work is the first to report the existence of intestinal permeability in transplant patients. Secondly, we characterised the functional alterations in the intestinal microbiota that could explain this loss of integrity of the intestinal barrier and evaluated a therapeutic strategy. Using a model of mycophenolic acid-related enteropathy at different stages of severity (moderate and severe), we were able to show a functional alteration in the microbiota characterised by a reduction in the production of SCFA and an alteration in the tight junctions between epithelial cells in the colon. Supplementation with SCFA in this model of moderate enteropathy corrects the loss of junction protein expression. In the same work, we also developed, validated, and standardised a preclinical model of allogeneic skin grafting in mice. This model will be used to explore the impact of short-chain fatty acid supplementation on graft outcome.

*Keywords*: transplantation, immunosuppressants, drug-related iatrogenesis, intestinal microbiota, metabolome

