



Dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte via le métabolisme du L-tryptophane

Morgane Modoux

► To cite this version:

Morgane Modoux. Dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte via le métabolisme du L-tryptophane. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS112 . tel-03724038

HAL Id: tel-03724038

<https://theses.hal.science/tel-03724038>

Submitted on 15 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 – Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

UMRS 938 – Microbiote, intestin et inflammation

Dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte via le métabolisme du L-tryptophane

Par **Morgane MODOUX**

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par **Harry SOKOL**

Présentée et soutenue publiquement le 21 avril 2022

Devant un jury composé de :

Pr. Karine Clément	PU-PH	Présidente du jury
Dr. Benoît Chassaing	Directeur de recherche	Rapporteur
Dr. Anne-Marie Cassard	Directrice de recherche	Rapporteuse
Pr. Patrick Emond	PU	Examineur
Pr. Harry Sokol	PU-PH	Directeur de thèse

*Car l'esprit n'est pas comme un vase qui a besoin d'être rempli ; c'est plutôt une substance qu'il s'agit
seulement d'échauffer ; il faut inspirer à cet esprit une ardeur d'investigation qui le pousse
vigoureusement à la recherche de la vérité.*

Plutarque

*Chacun de nous est fait de bien plus d'imprévisible que de probable. Nos existences sont autant faites
des occasions manquées que des événements qui les ponctuent. Nul ne peut vivre toutes les virtualités
qui étaient en lui, ni même les imaginer. Chaque instant qui passe laisse derrière soi une infinité de vies
possibles qui n'ont tenu qu'à un souffle. Le hasard, ce que l'individu en fait, sa volonté de chance ou son
abandon aux circonstances, dessinent des parcours personnels qui auraient pu être radicalement autres.*

David Le Breton

*Tout enfant est un chercheur. L'âge adulte fait souvent perdre cet étonnement, ces questionnements, et
on vit dans un monde rassurant car il est plus fait de réponses que de questions. Faire de la recherche
c'est conserver cette part d'enfance. Les connaissances, les réponses sont rassurantes mais n'épuisent
pas le questionnement.*

Jean Claude Ameisen

Ne sutor ultra crepidam

Pline l'Ancien

Cette obscure clarté

Jean Bouvet

AVANT-PROPOS

Mon travail de thèse rentre dans le cadre de l'obtention du diplôme de Doctorat de Sorbonne Université, en physiologie. Il étudie l'impact de métabolites microbiens sur l'activation du récepteur aux aryl hydrocarbures (AhR). Ce récepteur est, depuis maintenant plusieurs années, l'objet d'études croissantes compte tenu de son aspect immunomodulateur.

L'idée de ce travail de thèse est venue du constat que l'intestin est un écosystème complexe où interagissent plusieurs métabolites dérivés du microbiote. Compte tenu de l'activation de AhR par certains métabolites isolés, nous avons voulu étudier l'impact d'une combinaison de plusieurs de ces métabolites sur l'activation de AhR ainsi que les mécanismes de cette interaction. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'**Annexe 1** et ont été soumis pour publication à *Gut Microbes*.

L'activation et/ou l'inhibition de AhR sont des perspectives thérapeutiques très intéressantes. Ces perspectives ont d'ailleurs fait l'objet d'une revue portant sur le ciblage pharmacologique du métabolisme du L-tryptophane publié dans *Trends in Pharmacological Sciences* qui est disponible à l'**Annexe 2** (Modoux et al., 2021). Cette publication rentre dans le cadre de ma thèse d'exercice de pharmacie soutenue le 8 avril 2021. Lors de ma thèse, j'ai également pu participer aux travaux de Jane Natividad et Allison Agus sur l'impact de l'activation de AhR dans le syndrome métabolique. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Cell Metabolism* et est disponible à l'**Annexe 3**.

Quelques difficultés ont été rencontrées lors de ce travail de thèse : des résultats peu prometteurs à la fin de la 1ère année nous ont obligé à une réévaluation du sujet de recherche et l'épidémie de SARS-CoV2 a quelque peu freiné l'avancement des travaux.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur **Karine Clément** pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Un grand merci également au Docteur **Anne-Marie Cassard** et Docteur **Benoît Chassaing** pour leur disponibilité et leurs retours très constructifs concernant mon manuscrit.

J'adresse aussi mes remerciements au Professeur **Patrick Emond** et, de nouveau, au Professeur **Karine Clément** pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Professeur **Harry Sokol**, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail. Merci de m'avoir fait confiance avant même que je débute mon internat et d'avoir appuyé les demandes de financement du poste d'interne. Merci pour ton aide et ton soutien tout au long de ces 4 années.

J'aimerais remercier le Professeur **Jérémie Lefèvre** ainsi que l'ensemble du personnel du bloc opératoire et du CRB. C'était vraiment une chouette expérience !

Un immense merci à **Nathalie**, Entemutter, maman canard ou Octopus, (peu importe le nom tant qu'il y a la science !), merci pour ta patience et pour ton aide tout au long de ces années. J'imagine qu'un jour, d'ici quelques siècles (ou millénaires), les bandes sons des vocaux Whatsapp referont surface et que quelqu'un (ou quelque chose ?) s'attachera les cheveux à comprendre. Merci pour les heures de discussion, les pauses vaporeuses dans le bureau, les apéros labos (chuuuut !), les McTrottoirs, tes corrections de manuscrit (!!!) et les messages à 5H30 du matin. Ce n'est pas un simple merci mais un mercoincoin pour tout ce que tu as fait pour moi ! Et en route pour voir les bébés pandas !

Merci à **Cyriane**, Cycy, secondaire de travail (et de café-clopes), merci pour ta bonne humeur, tes questions bizarres, tes histoires encore plus bizarres et les séances de psychanalyse. Je n'oublierai pas mon bizutage à base de coating à l'anticorps de détection ou de décongélation de cellules hépatico-intestinales (chiche de les reconnaître au microscope !). Encore beaucoup de soirées crêpes à venir !

Merci à **Sothéa** pour l'aide dans la compréhension de l'immunologie, à **Chloé** pour ton aide sur les organoïdes et les pintes de blonde au soleil, à **Coco** et à **Charlotte**

pour tous les bons moments passés au labo, à **Inès** pour les pauses café philo débat, tes plans de plaque et tes ELISA transparents et à **Jean Bouvet**, partenaire du lundi matin porte 10 et du vendredi soir, j'attends toujours tes 180 extractions de HT29 (« il fait beau, on voit bien les culots ! »).

Merci à toute l'équipe « **du DouZzz** » ainsi qu'à toutes les personnes « **du SiX** », aux 17 groupes Whatsapp, aux congélateurs capricieux qui ne sonnent qu'après minuit - jour férié - dimanche (rayez la mention inutile), au Supersonic, aux blouses blanches, au traiteur asiatique, au Bar à Mines et ses Cocoloco et à Plantes pour Tous. Ne changez rien, on a besoin de vous.

Merci aux potes, jamais bien loin pour me dévier de mon chemin, un Ginto dans la main. Merci à Jonathan, Roomesh, Garik, Mathieu, JB, Emilie, Julien, Charlotte, Baptiste, Elodie et tous ceux que j'oublie.

Un merci tout particulier à mes parents, à ma grand-mère et à ma sœur Marine pour leur soutien sans faille tout au long de mon parcours, de la 1^{ère} année de pharma à la thèse de science en passant par l'internat et la thèse d'exercice. Merci d'avoir enduré mon caractère quelque peu irritable dans les moments de pression et d'être toujours là.

Merci à Christina Aguilera d'avoir accompagné mes repos de garde.

Merci à Mr K., pour la curiosité scientifique qu'il m'a insufflée, au Dr. Laurent Bermont pour la passion de la biochimie métabolique et au Dr T. qui m'aura permis d'aller au bout mon cursus.

RESUME

Le L-tryptophane (L-trp) est un acide aminé essentiel dont certains métabolites microbiens et humains possèdent des effets immunomodulateurs via leur liaison sur le récepteur aux aryl hydrocarbones (AhR). Ce récepteur est présent au niveau des cellules épithéliales et immunitaires et contrôle, entre autres, le métabolisme des xénobiotiques, la sécrétion de peptides antimicrobiens, la réponse immunitaire mais également la composition du microbiote intestinal. Notre équipe a mis en évidence une diminution de certains métabolites du L-trp activant AhR dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ainsi que dans le syndrome métabolique. Placé à l'interface entre l'hôte et le microbiote, AhR présente un fort potentiel thérapeutique dans les maladies inflammatoires. Décoder les mécanismes de son activation et de sa régulation par les métabolites du microbiote est crucial pour comprendre les conséquences des dysbioses qui font le lit de nombreuses pathologies. L'objectif global de ce projet de thèse est (i) d'étudier les interactions de différentes classes de métabolites bactériens au niveau de AhR et (ii) de décrypter les mécanismes sous-jacents qui entrent en jeu dans la communication entre l'hôte et son microbiote via l'activation de AhR.

Nous avons montré une synergie d'activation de AhR en présence de métabolites du L-trp avec les acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate et acétate) à la fois sur des lignées cellulaires *in vitro* ainsi que sur des explants coliques humains. Nos premières investigations ont montré que le butyrate n'agissait pas comme un ligand de AhR puisqu'il (i) ne se fixait pas au récepteur, (ii) n'induisait ni la translocation nucléaire de AhR, (iii) ni sa dimérisation avec ARNT. L'étude des mécanismes indirects d'activation de AhR a montré que le butyrate (i) n'inhibait pas l'activité des cytochromes de classe 1 responsables de la dégradation des ligands de AhR, (ii) n'agissait pas via ses récepteurs couplés aux protéines G et (iii) n'agissait pas par l'intermédiaire de son activité inhibitrice du protéasome pour activer AhR. En revanche, la synergie semblait reposer sur certaines modifications épigénétiques qui ont été confirmées (i) par méthode d'immunoprécipitation de la chromatine montrant une augmentation du recrutement de AhR au niveau du promoteur de cyp1a1 lorsque le butyrate était additionné au FICZ et (ii) en utilisant l'inhibiteur de HDAC trichostatine A permettant de mimer l'effet du butyrate sur l'activation de AhR médiée par FICZ.

En conclusion, ces résultats soutiennent l'existence d'interactions complexes entre de multiples métabolites dérivés de l'intestin qui méritent une exploration approfondie. En outre, ils ouvrent la voie à de nouvelles thérapies pour moduler les activités AhR dans l'intestin, en utilisant des produits biothérapeutiques vivants produisant du butyrate et des indoles, ou en utilisant

directement des mélanges de métabolites ou via des ligands AhR puissants produits par mimétisme de métabolites microbiens.

Mots clefs : L-tryptophane ; Récepteur aux aryl hydrocarbures ; Métabolites ; Microbiote ; Acides gras à chaîne courte ; Epigénétique

ABSTRACT

L-tryptophan is an essential amino acid whose microbial and human metabolites have immunomodulatory effects via their binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR). This receptor is present in epithelial and immune cells and controls, among other things, the metabolism of xenobiotics, the secretion of antimicrobial peptides, the immune response but also the composition of the intestinal microbiota. Our team has demonstrated a decrease in certain AhR-activating L-trp metabolites in chronic inflammatory bowel disease and metabolic syndrome. Placed at the interface between the host and the microbiota, AhR has a strong therapeutic potential in inflammatory diseases. Deciphering the mechanisms of its activation and regulation by microbiota metabolites is crucial for understanding the consequences of dysbiosis, which is the basis of many pathologies. The overall objective of this thesis project is (i) to study the interactions of different classes of bacterial metabolites at the level of AhR and (ii) to decipher the underlying mechanisms involved in the communication between the host and its microbiota via AhR activation.

We have shown synergistic activation of AhR in the presence of L-trp metabolites with short-chain fatty acids (butyrate, propionate and acetate) both in in vitro cell lines and in human colonic explants. Our initial investigations showed that butyrate did not act as a ligand for AhR since it (i) did not bind to the receptor, (ii) did not induce nuclear translocation of AhR, (iii) nor its dimerization with ARNT. The study of the indirect mechanisms of AhR activation showed that butyrate (i) did not inhibit the activity of class 1 cytochromes responsible for the degradation of AhR ligands, (ii) did not act via its G protein-coupled receptors and (iii) did not act via its proteasome inhibitory activity to activate AhR. Instead, the synergy appeared to rely on certain epigenetic modifications which were confirmed (i) by chromatin immunoprecipitation method showing an increase in AhR recruitment at the *cyp1a1* promoter when butyrate was added to FICZ and (ii) by using the HDAC inhibitor trichostatin A to mimic the effect of butyrate on FICZ-mediated AhR activation.

In conclusion, these results support the existence of complex interactions between multiple gut-derived metabolites that deserve further exploration. Furthermore, they open the way to new therapies to modulate AhR activities in the gut, using live biotherapeutics producing butyrate and indoles, or using mixtures of metabolites directly or via potent AhR ligands produced by mimicking microbial metabolites.

Keywords: L-tryptophan; Aryl hydrocarbon receptor; Metabolites; Microbiota; Short chain fatty acids; Epigenetics

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	7
REMERCIEMENTS.....	9
RESUME.....	11
ABSTRACT	13
TABLE DES MATIERES	15
ABREVIATIONS.....	17
LISTE DES FIGURES.....	19
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	21
I. LE MICROBIOTE INTESTINAL.....	21
1. Définition et composition.....	21
2. Fonctions	22
2.1. Nutrition	22
2.2. Homéostasie intestinale.....	22
2.3. Production de métabolites.....	23
3. Altérations pathologiques du microbiote	39
II. RECEPTEUR AUX ARYL HYDROCARBURES	41
1. Structure	41
2. Mécanisme d'activation	43
2.1. Activation, translocation et dimérisation.....	43
2.2. Transcription des gènes cibles	44
2.3. Extinction du signal activateur	46
3. Ligands de AhR.....	49
3.1. Ligands exogènes.....	50
3.2. Ligands endogènes	51
4. AHR : rôle physiologique et pathologique	53
4.1. Organisation du système intestinal.....	53
4.2. Barrière intestinale	54
4.3. Système immunitaire intestinal	55
4.4. AhR et pathologie : implications dans les MICI.....	60
CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX	63
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	67
Résultats expérimentaux – Manuscrit Annexe 1	68
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	73
1. Discussion et perspectives de mon travail de thèse.....	73
2. Perspectives à plus long terme	91

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	97
ANNEXES	107
ANNEXE 1	109
ANNEXE 2.....	147
ANNEXE 3.....	163

ABREVIATIONS

3-HK	3-hydroxykynurénine	IL-	Interleukine -
5-HIAA	Acide 5-hydroxyindole acétique	IPA	Acide indole propionique
5-HT	Sérotonine	IPyA	Indole 3 pyruvate
ACMSD	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdéhyde décarboxylase	ITE	2-(1'H-indole-3'carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester
AGCCs	Acides gras à chaîne courte	KAT	Kynurénine aminotransférase
AhR	Récepteur au aryl hydrocarbures	KP	Voie de la kynurénine (kynurenine pathway)
AhRR	Répresseur de AhR	KYNA	Acide kynurénique
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	LIEs	Lymphocytes intra-épithéliaux
BHE	Barrière hématoencéphalique	L-kyn	L-kynurénine
CDs	Cellules dendritiques	LPS	Lipopolysaccharide
CEC	Cellules entérochromaffines	L-trp	L-tryptophane
CEE	Cellules entéroendocrines	MC	Maladie de Crohn
CEI	Cellules épithéliales intestinales	MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
CLI	Cellules lymphoïdes innées	MPT	Modifications post-traductionnelles
CYP	Cytochrome P450	PICA	Acide picolinique
DREs	Éléments de réponse aux dioxines	PYY	Peptide intestinal Y
FICZ	6-formylindolo [3,2-b] carbazole	QUIN	Acide quinolinique
GLP-1	Glucagon like peptide 1	RCH	Rectocolite hémorragique
GST	Glutathion-S-transférase	RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
HAH	Hydrocarbure aromatique halogéné	TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-dioxine
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique	TDO 1	Tryptophane 2,3-dioxygénase
HAT	Histone acétyltransférase	TH	T helper (lymphocyte)
HDAC	Histone désacétylase	TPH	Tryptophane hydroxylase
IAA	Acide indole acétique	Treg	Lymphocytes T régulateurs
IAld	Indole 3 aldéhyde	TSA	Trichostatine A
ICZ	Indolo [3,4-b] carbazole	UGT	UDP-glucuronosyl transférase
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygénase	XANA	Acide xanthurénique
iHDAC	Inhibiteur d'HDAC	XREs	Éléments de réponse aux xénobiotiques

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principaux métabolites produits par le microbiote intestinal à partir des glucides, des lipides et des protéines alimentaires

Figure 2 : Schéma simplifié de la synthèse des AGCCs

Figure 3 : Métabolisme du L-trp. Figure modifiée d'après Modoux et al (Modoux et al., 2021)

Figure 4 : Dynamique d'acétylation / désacétylation médiée par les enzymes HAT et HDAC au niveau de la chromatine

Figure 5 : Structure de la protéine AhR d'après Stockinger et al (Stockinger et al., 2014)

Figure 6 : Mécanisme d'action du récepteur AhR après fixation du ligand

Figure 7 : Mécanismes de rétroaction négative du récepteur AhR

Figure 8 : Effet de la combinaison de métabolites sur l'activation de AhR

Figure 9 : Impact du butyrate sur l'expression de *ARNT* après 8H (HepG2) ou 6H (HT29) de stimulation

Figure 10 : Impact du butyrate sur l'expression de *AhR* après 8H (HepG2) ou 6H (HT29) de stimulation

Figure 11 : Impact de FFAR2 et FFAR3 sur l'activation synergique de AhR par la combinaison du butyrate et de FICZ sur les cellules HepG2^{luc}

Figure 12 : Impact de l'inhibition de SMCT1 par l'ibuprofène (100μM) sur l'activation de AhR médiée par le butyrate (1mM) et par FICZ (10ng/ml) sur les cellules HepG2^{luc}

Figure 13 : Impact de l'inhibition de MCT1 par le pCM (10μM) sur l'activation de AhR médiée par le butyrate (1mM) seul ou en combinaison avec FICZ (10ng/ml) sur les cellules HepG2^{luc}

Figure 14 : Impact de l'inhibition de HDAC1 par le MS-275 (250nM) sur l'activation de AhR médiée par le butyrate (1mM) ou par FICZ (10ng/ml) sur les cellules HepG2^{luc}

Figure 15 : Impact de l'inhibition de HDAC3 par le RGFP966 (1μM) sur l'activation de AhR médiée par le butyrate (1mM) ou par FICZ (10ng/ml) sur les cellules HepG2^{luc}

I. LE MICROBIOTE INTESTINAL

1. Définition et composition

Le tractus gastro-intestinal abrite une collection diversifiée de micro-organismes (virus, bactéries, archées et protozoaires) que l'on appelle microbiote intestinal et qui se localise principalement au niveau de l'intestin grêle et du côlon. Il s'agit d'un écosystème complexe au sein duquel plusieurs espèces dépendent les unes des autres, se font concurrence et s'influencent mutuellement. Environ 10^{13} micro-organismes se répartissent suivant un gradient de concentration avec une densité maximale au niveau du côlon. Le microbiote bactérien se compose de plus de 4000 espèces bactériennes qui se répartissent en 12 phyla dont 3 ne sont représentés que par une seule espèce, comme *Akkermansia muciniphila*, seule représentante du phylum Verrucomicrobia. 93,5% des bactéries connues font parties des 4 principaux phyla : Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria et Actinobacteria (Thursby and Juge, 2017). Environ 300 espèces sont présentes chez chaque individu et il a été proposé la notion de « core microbien » pour représenter l'ensemble des gènes microbiens retrouvé systématiquement chez tous les individus. Le microbiote central serait ainsi défini au niveau fonctionnel plutôt qu'au niveau des espèces présentes (Thursby and Juge, 2017).

2. Fonctions

L'ensemble des microorganismes composant le microbiote, et plus particulièrement les bactéries, jouent un rôle fondamental dans l'homéostasie de l'hôte. Elles assurent une fonction de barrière empêchant l'invasion des pathogènes et participent à plusieurs fonctions métaboliques comme la fermentation des glucides, la production de vitamines, le métabolisme des xénobiotiques, l'établissement et la maturation du système immunitaire et la modulation de l'expression des gènes de l'hôte ([Lavelle and Sokol, 2020](#)).

2.1. Nutrition

La relation entre le microbiote intestinal et l'hôte est de type mutualiste. L'hôte fournit une niche écologique et de la nourriture aux bactéries qui, en retour, aident l'hôte dans la digestion des aliments complexes (notamment la fermentation des fibres) et pour l'assimilation des acides aminés, vitamines et minéraux ([Thursby and Juge, 2017](#)). Le microbiote intestinal participe aussi à la synthèse *de novo* de vitamines essentielles comme la vitamine B12 (produites par les bactéries dites lactiques), la vitamine B9 impliquée dans la synthèse et la réparation de l'ADN, la vitamine K, la riboflavine, la biotine, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique, la pyridoxine et la thiamine ([Thursby and Juge, 2017](#)).

2.2. Homéostasie intestinale

La présence du microbiote est indispensable dans la promotion de l'intégrité et du renouvellement des cellules épithéliales. Il joue également un rôle déterminant dans le

développement de la muqueuse intestinale et du système immunitaire, comme le montre la déficience de plusieurs types de cellules immunitaires et de structures lymphoïdes chez les animaux axéniques ([Thursby and Juge, 2017](#)). De par sa présence, le microbiote crée une barrière physique qui influe sur la colonisation des agents pathogènes, notamment par compétition pour les sites d'attachement ou les sources de nutriments. Il possède également un rôle indirect en stimulant la production par l'hôte de divers composés antimicrobiens par les cellules de Paneth ([Thursby and Juge, 2017](#)). Enfin, le microbiote joue un rôle dans l'activation du système neuromusculaire intestinal impliqué dans le péristaltisme via notamment par la production de sérotonine (**5-HT**) par les cellules entérochromaffines (**CEC**), un neurotransmetteur clef dans la motricité intestinale ([Yano et al., 2015](#)).

2.3. Production de métabolites

La modulation du métabolisme et de l'immunité de l'hôte par son microbiote dépend principalement de l'échange entre la lumière intestinale et la surface épithéliale de petites molécules, appelées métabolites. Le microbiote intestinal synthétise, module et dégrade une importante variété de métabolites. Les produits microbiens peuvent dépendre de l'alimentation et se classent alors en deux grandes catégories : les produits issus directement de la digestion ou de la fermentation des composants alimentaires par le microbiote intestinal et les produits du métabolisme de l'hôte secondairement modifiés biochimiquement par ce microbiote. La première catégorie regroupe les acides gras à chaîne courte ((**AGCCs**) : acétate, butyrate, propionate) ou à chaîne ramifiée (isobutyrate, isovalérate) issus de la fermentation des fibres ainsi que les métabolites du L-tryptophane (**L-trp**) issus de la dégradation des protéines. La seconde catégorie comprend la

transformation par le microbiote intestinal des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. Les produits microbiens indépendants de l'alimentation sont quant à eux synthétisés *de novo* par le microbiote et comprennent les lipopolysaccharides (**LPS**) et les peptidoglycanes. Plus de 50 % des métabolites présents dans les fèces et les urines sont dérivés ou modifiés par le microbiote intestinal (Wang et al., 2019). Ces métabolites microbiens interagissent avec les cellules entéroendocrines (**CEE**), les CEC et le système immunitaire muqueux. Certains peuvent même traverser la barrière hémato-encéphalique (**BHE**) (Martin et al., 2018). Les métabolites sécrétés par le microbiote, appelés collectivement « métabolome », jouent un rôle essentiel dans la communication entre le microbiote et son hôte. Quelques-uns de ces métabolites seront détaillés dans la suite de ce manuscrit.

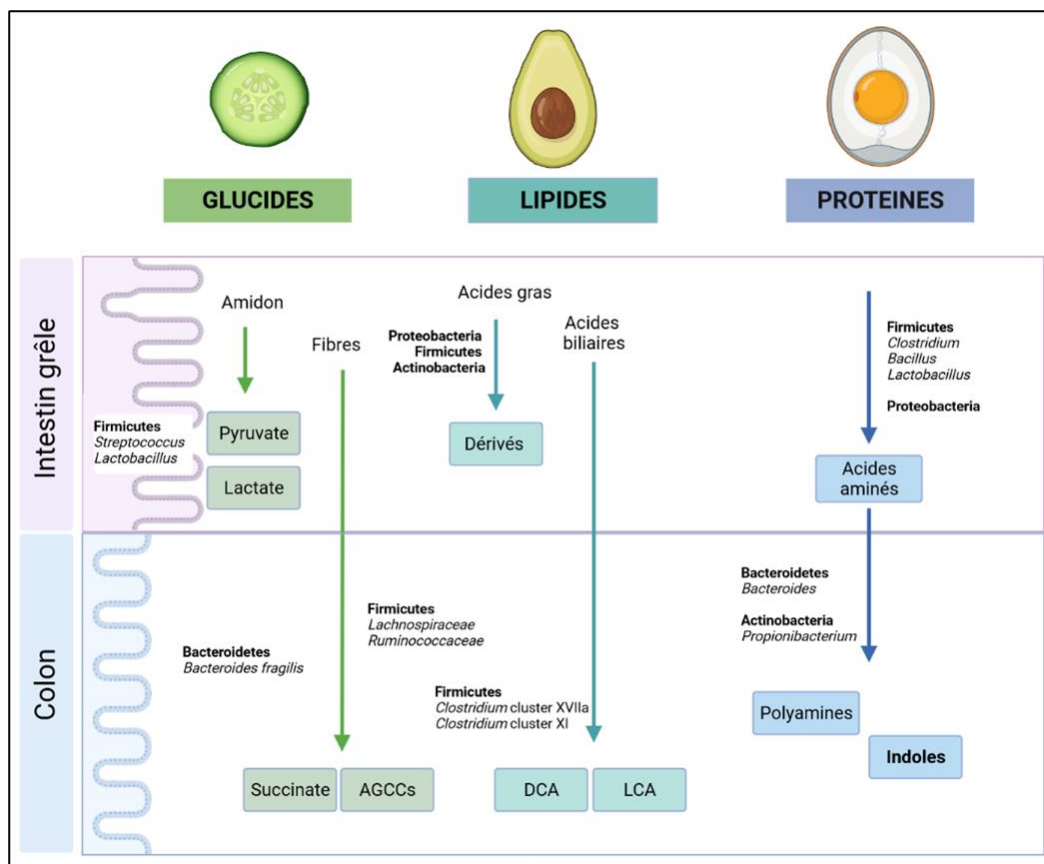


Figure 1 : Principaux métabolites produits par le microbiote intestinal à partir des glucides, des lipides et des protéines alimentaires. AGCCs : acides gras à chaîne courte ; DCA : acide déoxycholique ; LCA : acide lithocolique

2.3.1. Acides gras à chaîne courte

Les AGCCs, également appelés acides gras volatils, sont des acides carboxyliques linéaires organiques contenant moins de six atomes de carbone. Ils sont synthétisés par le microbiote intestinal à partir des fibres non digestibles (amidon résistant, inuline, son de blé, cellulose et pectine), principalement dans le cæcum et le colon par des microorganismes anaérobies ([He et al., 2020](#); [Parada Venegas et al., 2019](#)). On estime que les fibres alimentaires constituent 5 à 10% de l'apport énergétique dans la société occidentale ([Krautkramer et al., 2020](#)). L'acétate (C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4) sont les AGCCs les plus abondants ($\geq 95\%$) avec une concentration dans le colon humain de 75, 30 et 20mM respectivement et un ratio molaire de 60:20:20 environ ([Fellows and Varga-Weisz, 2019](#); [Krautkramer et al., 2020](#)). L'acétate est produit par de nombreuses bactéries, alors que le propionate et le butyrate sont produits par des bactéries spécifiques ([Rowland et al., 2018](#)).

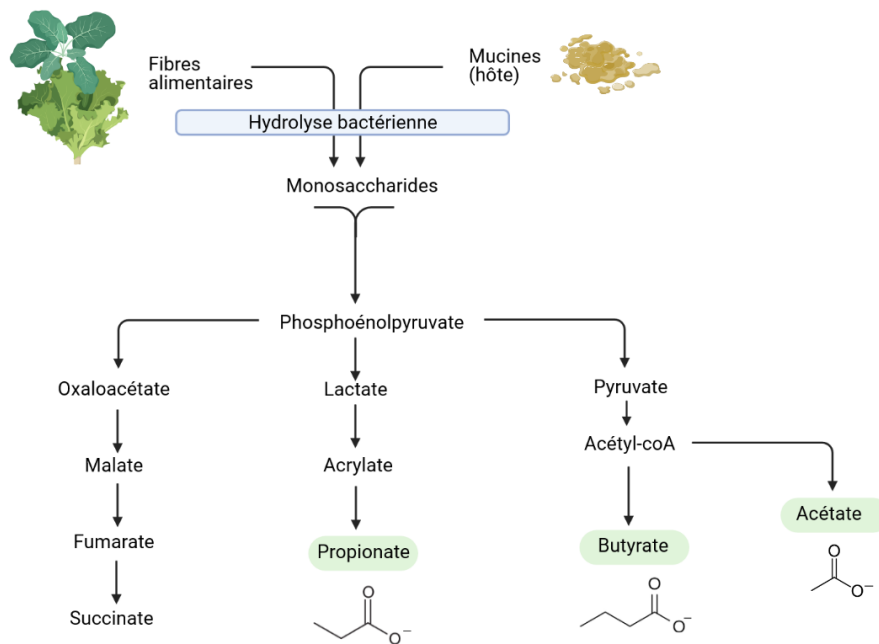


Figure 2 : Schéma simplifié de la synthèse des AGCCs

Bien que beaucoup moins abondants, les acides gras à chaîne ramifiée (isobutyrate, 2-méthylbutyrate et isovalérate), ainsi que les intermédiaires lactate et succinate produits peuvent exercer des effets biologiques. (Krautkramer et al., 2020). Des substrats mineurs comme les protéines alimentaires ou la couche de mucus du colon (composée essentiellement de mucines fortement glycosylées) peuvent entrer dans la synthèse des AGCCs (Krautkramer et al., 2020).

❖ Synthèse

Le butyrate est formé à partir de la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA et du butyryl-CoA par plusieurs Firmicutes comme *Coprococcus comes* ou *Faecalibacterium prausnitzii* (Louis et al., 2004).

L'acétate est produit à partir du pyruvate par la voie de l'acétyl-CoA ou par la voie Wood-Ljungdahl. Les bactéries du microbiote intestinal *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Ruminococcus* spp. produisent du pyruvate à partir de l'acétyl-coA alors que *Blautia hydrogénotrophica*, *Clostridium* spp. et *Streptococcus* spp. le produisent via la voie de Wood-Ljungdahl (Krautkramer et al., 2020).

Le propionate peut être synthétisé à partir du succinate, du lactate ou via la voie du propanediol à partir des desoxyoses comme le fucose et la rhamnose (Koh et al., 2016; Krautkramer et al., 2020).

❖ Absorption

Environ 90 à 95% des AGCCs produits sont absorbés dans le côlon, principalement par diffusion passive à travers la membrane épithéliale. Le reste est transporté dans la cellule par deux familles de protéines appelées MCT et SMCT (Wong et al., 2006). MCT1 est considéré comme le principal transporteur responsable de l'absorption du butyrate dans les cellules épithéliales intestinales (**CEI**) (Parada Venegas et al., 2019). SMCT1 transporte les trois AGCCs et permet également la réabsorption d'eau dans le côlon (Gasaly et al., 2021). Alors que l'acétate et le propionate sont libérés dans la circulation sanguine par la veine porte, le butyrate est principalement absorbé et métabolisé par l'épithélium du côlon où il constitue la source d'énergie principale des colonocytes normaux (Fellows and Varga-Weisz, 2019)

❖ Cibles

Les AGCC ciblent plusieurs entités cellulaires qui comprennent des récepteurs couplés aux protéines G (**RCPGs**) ainsi que des enzymes impliquées dans la régulation de l'expression des gènes que sont les histones désacétylases (**HDACs**) et les histones acétyltransférases (**HATs**).

- Récepteurs membranaires

Les AGCC modulent le métabolisme, l'inflammation, la production d'hormones, la lipogenèse et l'homéostasie intestinale via la liaison à leurs récepteurs. Ces récepteurs comprennent les RCPGs FFAR2 et FFAR3 (anciennement dénommés GPR43 et GPR41 avant leur déorphanisation en 2003), et HCAR2 (anciennement appelé GPR109a) ([Husted et al., 2017](#)). La sélectivité de ces récepteurs varie selon l'AGCC étudié : FFAR2 et FFAR3 reconnaissent l'acétate, le propionate et le butyrate avec des affinités et une expression tissulaire différentes ([Husted et al., 2017](#)). Parmi les AGCCs, seul le butyrate se lie à HCAR2.

GPR109A/HCAR2

Le récepteur HCAR2 est un récepteur couplé à la protéine G α i. Il est abondamment exprimé dans la membrane apicale des entérocytes humains et murins et son expression est induite par le microbiote intestinal ([Cresci et al., 2010](#)). Le butyrate est un agoniste physiologique de HCAR2 ([Thangaraju et al., 2009](#)).

GPR43/FFAR2

FFAR2 possède un double couplage $G_{\alpha i}$ / o et $G_{\alpha q}$. Au niveau intestinal, FFAR2 est exprimé uniquement au niveau de la muqueuse colique sous la dépendance du microbiote intestinal ([Koh et al., 2016](#); [Mishra et al., 2020](#)). L'acétate et le propionate sont les activateurs les plus puissants de FFAR2 avec une CE50 d'environ 20 à 300 μ M, compatible avec leurs concentrations intestinales ([Koh et al., 2016](#); [Liu et al., 2020](#)).

GPR41/FFA3

FFAR3 est un récepteur couplé à la protéine $G_{\alpha i}$ activé préférentiellement par le propionate et le butyrate ([Koh et al., 2016](#); [Poul et al., 2003](#)). FFAR3 est présent au niveau des cellules immunitaires, des CEEs, du pancréas endocrinien, des neurones sympathiques et entériques ainsi qu'au niveau des nerfs vagues afférents où il est impliqué dans la régulation de l'inflammation, la sécrétion de glucagon-like peptide 1 (**GLP-1**) et l'activité neuronale ([Husted et al., 2017](#)).

- Cibles épigénétiques : HDAC et HAT

Chaque cellule du corps d'un organisme eucaryote multicellulaire possède l'ensemble du génome dans son noyau, emballé dans une superstructure très complexe appelée chromatine dont l'unité de construction de base s'appelle le nucléosome. Le nucléosome est composé de huit protéines histones centrales (H2A, H2B, H3 et H4) autour desquelles l'ADN s'enroule. La structure est scellée par une protéine histone supplémentaire appelée H1. Les queues d'histones qui dépassent du corps du nucléosome central sont le lieu de multiples modifications post-traductionnelles (**MPT**). Ces MPT s'inscrivent dans divers

mécanismes régulateurs de l'expression des gènes regroupés sous le terme d'épigénétique (Fellows and Varga-Weisz, 2019). L'une des MPT les plus étudiées est l'acétylation des histones. Cette modification se produit sur les résidus lysine situés sur les queues N-terminales des histones (principalement H3 et H4). L'acétylation des histones est associée à une chromatine permissive, transcriptionnellement active. Cette modification est médiée par les enzymes HATs et contrecarrée par les HDACs (Fellows and Varga-Weisz, 2019).

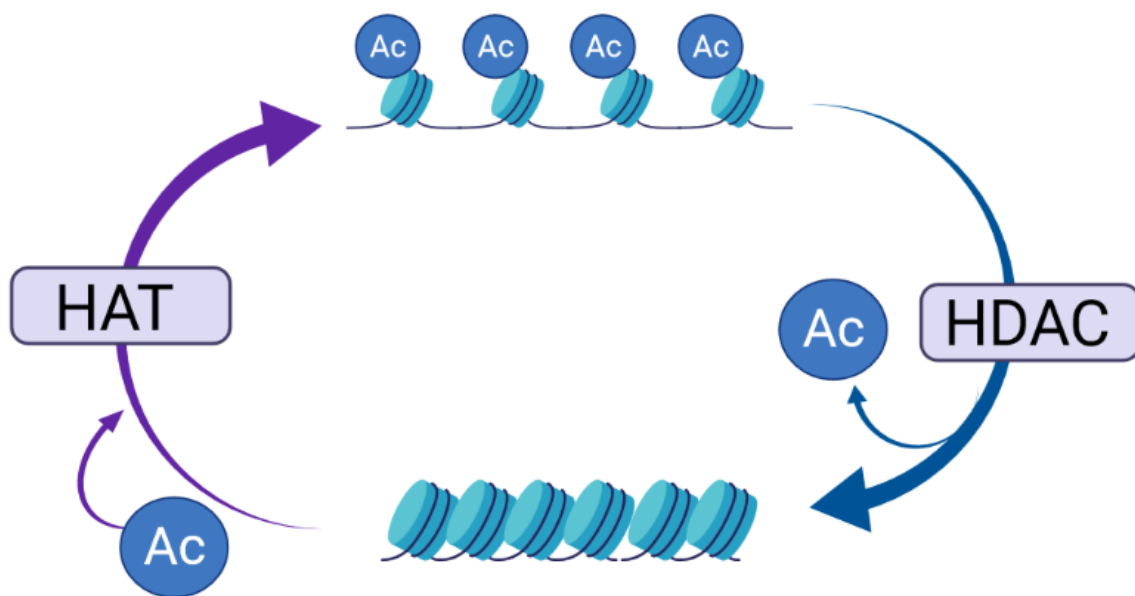


Figure 1 Dynamique d'acétylation et de désacétylation médiée par les enzymes HATs et HDACs au niveau de la chromatine Ac : groupement acétyl ; HAT : histone acétyltransférase; HDAC : histone désacétylase

HDAC

Les HDACs désignent une famille de protéines catalysant l'élimination des groupements acétyl au niveau des résidus lysine de la chaîne peptidique. Chez l'homme, il existe 18 enzymes HDAC divisées en quatre classes (I, II, III et IV) (Schilderink et al., 2013). Le butyrate fut l'un des premiers métabolites endogènes ayant montré une capacité à inhiber

l'activité HDAC, préférentiellement les classes I et IIa ([Schilderink et al., 2013](#)). Par la suite, son activité inhibitrice des HDACs s'est montrée impliquée dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, le renforcement de la barrière épithéliale et a aussi été impliquée dans les effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs du butyrate ([Liu et al., 2018](#)).

HAT

Les HATs catalysent l'ajout de groupements acétyl au niveau des queues des histones et portent généralement une activité de coactivateur transcriptionnel. Lorsqu'elles sont recrutées par un facteur de transcription au niveau du promoteur d'un gène cible, elles augmentent le niveau d'histones acétylés au niveau de ce promoteur rendant la chromatine permissive ([Schilderink et al., 2013](#)). L'activité HAT du butyrate a été découverte plus tardivement dans un processus appelé « paradoxe du butyrate » qui dépend du phénotype de la cellule. Dans l'épithélium colique normal, le butyrate est utilisé comme substrat énergétique et génère de l'acétyl-CoA (« donneur d'acétyl » utilisé par les HATs) au niveau du cycle de l'acide citrique ([Koh et al., 2016](#); [Krautkramer et al., 2020](#)). Sa consommation par les cellules protège ainsi les cellules souches en atténuant son activité d'inhibiteur d'HDAC (**iHDAC**) ([Koh et al., 2016](#)). Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses utilisent le glucose comme substrat énergétique dans un processus appelé effet Warburg. Le butyrate n'est alors plus oxydé et s'accumule au niveau du noyau où l'élévation de sa concentration lui permet d'agir comme iHDAC efficace ([Koh et al., 2016](#)). Bien que l'inhibition des HDACs et l'induction des HATs aboutissent à augmenter l'acétylation des histones, les gènes affectés sont différents

([Donohoe et al., 2012](#)). Ainsi, de faibles doses de butyrate stimulent l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires tandis que des doses plus élevées les inhibent et augmentent les gènes impliqués dans l'apoptose. Le butyrate, en fonction de sa concentration, peut ainsi induire différents effets dans un contexte spécifique à la cellule et à l'environnement via des programmes d'expression génique opposés ([Krautkramer et al., 2020](#)).

❖ Fonctions physiologiques

❖ Métabolisme énergétique

Le butyrate est la principale source énergétique des colonocytes. Une proportion significative de butyrate est rapidement absorbée et consommée localement dans l'intestin où il subit une β -oxydation, suivie d'une métabolisation dans le cycle de Krebs et une oxydation en CO_2 par le système de phosphorylation oxydative mitochondriale, permettant la production d'ATP ([den Besten et al., 2013](#)). Ce phénomène fournit 70 à 80% des besoins énergétiques des colonocytes sains et permet la réabsorption d'eau et d'électrolytes en générant l'énergie nécessaire à l'activité Na^+/K^+ -ATPase. L'acétyl CoA produit à partir du butyrate est aussi utilisé pour la synthèse lipidique et l'acétylation des histones par les HATs. L'oxydation du butyrate dans les colonocytes consomme de l'oxygène ce qui en fait une voie métabolique primordiale dans l'épuisement de l'oxygène intracellulaire. La réduction de la quantité d'oxygène dans la cellule empêche sa migration dans la lumière intestinale et permet de maintenir l'environnement anaérobie nécessaire aux bactéries anaérobies strictes du colon. En l'absence de butyrate, les cellules épithéliales utilisent du glucose pour la production d'énergie, faisant passer leur

métabolisme de la β -oxydation à la glycolyse anaérobie avec pour conséquence une faible consommation d'oxygène et une réduction de l'environnement anaérobie (Gasaly et al., 2021). Chez les souris axéniques, les colonocytes sont fortement privés d'énergie comme l'indique la diminution de l'expression des enzymes clefs impliquées dans le métabolisme des acides gras (Donohoe et al., 2011). Par conséquent, ces cellules présentent un déficit marqué de la respiration mitochondriale souligné par une diminution du rapport NADH/NAD⁺, de la production d'ATP ainsi que de la phosphorylation oxydative. L'ajout de butyrate aux colonocytes isolés de souris axéniques permet de normaliser ce déficit (Donohoe et al., 2011). Contrairement au butyrate, l'acétate et le propionate entrent dans la circulation systémique et sont principalement métabolisés au niveau du foie. Ils y subissent une β -oxydation les convertissant en acétyl-CoA qui peut secondairement entrer dans le cycle de l'acide citrique ou la synthèse des corps cétoniques (Stilling et al., 2016). Au niveau intestinal, l'acétate est également converti en glucose à travers la néoglucogénèse (Rowland et al., 2018).

On note la présence des récepteurs aux AGCCs au niveau de cellules impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique. FFAR2 est par exemple fortement exprimé sur les cellules L qui produisent le peptide intestinal YY (**PYY**) et le GLP-1. L'activation du récepteur induit la libération du peptide anorexigène PYY et de l'hormone hyperinsulinémiante GLP-1 (Tan et al., 2014).

❖ Maintien de l'homéostasie intestinale

L'intégrité de l'intestin est assurée par une séparation efficace entre le contenu luminal et l'hôte et est médiée en grande partie par la barrière épithéliale ainsi que par une couche de mucus qui limite l'accès physique des bactéries à l'épithélium. Il a été montré *in vitro*

que le butyrate accélérât l'assemblage des protéines ZO-1 et occludine de la jonction serrée renforçant l'imperméabilité épithéliale (Tan et al., 2014). Son effet inducteur sur l'expression de *MUC2* a également été rapportée *in vitro* (HT29) ainsi que sur des biopsies intestinales de patients atteints de rectocolite hémorragique (**RCH**) (dose de 0,5mM). *In vivo*, il protège également la barrière intestinale dans la colite induite par *Citrobacter rodentium* ou par le TNBS (Gasaly et al., 2021).

Le maintien de cette homéostasie repose également sur l'expression et la sécrétion d'interleukine (**IL-**) 22. Cette cytokine, libérée à la fois par les cellules lymphoïdes innées (**CLIs**) de type 3 et les cellules T CD4 +, agit sur les CEIs pour induire la sécrétion de peptides antimicrobiens et favoriser la fonction de barrière épithéliale (Gasaly et al., 2021).

❖ Actions anti-inflammatoires

Les AGCCs exercent également des effets anti-inflammatoires dans la muqueuse intestinale par l'inhibition des HDAC et l'activation des RCPGs présents dans les CEIs et les cellules immunitaires. De manière générale, l'inhibition des HDACs entraîne un phénotype anti-inflammatoire avec une diminution de la production des cytokines inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF α et une diminution de l'activité de NF- κ B dans les cellules immunitaires innées humaines de manière similaire à la trichostatine A (**TSA**) (Tan et al., 2014). Au niveau des cellules immunitaires adaptatives, l'inhibition des HDACs par les AGCCs joue également un rôle anti-inflammatoire. Il a par exemple été montré que l'activité iHDAC du butyrate au niveau du locus *Foxp3* joue un rôle dans la différenciation et la fonction suppressive des cellules T régulatrices (**Treg**) périphériques et permet aux cellules Treg coliques de protéger du développement de la colite (Furusawa et al., 2013). Le butyrate favorise aussi les propriétés anti-inflammatoires en engageant les RCPGs. Au

niveau des cellules immunitaires innées, le butyrate empêche la libération d'oxyde nitrique, d'IL-6 et d'IL-12 en réponse LPS par un mécanisme dépendant de FFAR3. HCAR2 est également impliqué puisqu'il favorise un phénotype anti-inflammatoire dans les macrophages coliques et les cellules dendritiques (**CDs**), induisant la différenciation des cellules Tregs et la sécrétion d'IL-10 ([Gasaly et al., 2021](#)). Enfin, les AGCCs modulent la chimiotaxie des cellules immunitaires, la libération d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que la libération de cytokines. Ils agissent également sur la suppression de l'activité NF- κ B ([Tan et al., 2014](#)).

Les AGCCs régulent de nombreuses fonctions physiologiques de l'hôte et leur déficit de production a été associé à une liste croissante d'états pathologiques comprenant les maladies cardiométaboliques (athérosclérose, obésité, syndrome métabolique et le diabète de type 2, stéatose hépatique non alcoolique), les troubles neurologiques et neuropsychiatriques (Parkinson, Alzheimer, trouble du spectre autistique, anxiété et dépression).

2.3.2. Métabolisme du L-tryptophane

Le L-trp est un acide aminé essentiel que l'on trouve dans les aliments courants tels que le lait, le fromage, le poisson, les bananes, l'avoine, la volaille et le chocolat. Cet acide aminé est le moins abondant à la fois en termes de sa présence dans les protéines mais aussi en tant qu'acide aminé libre dans les cellules. Après absorption intestinale, le L-trp alimentaire a plusieurs destins possibles chez les mammifères. Au niveau des cellules de l'hôte, il peut entrer dans les voies de synthèse des kynurénines ou de la 5-HT, la part

non métabolisée étant destinée à la synthèse des protéines. Au niveau du colon, le L-trp non absorbé en amont subit une transformation par le microbiote intestinal en composés à structure indole dont certains possèdent la capacité d'activer le récepteur aux aryl hydrocarbures (**AhR**) ([Krautkramer et al., 2020](#)). AhR joue lui-même un rôle régulateur de la voie des kynurénines (**KP**) en influant les niveaux d'expression des deux enzymes limitantes tryptophane 2,3-dioxygénase (**TDO**) et indoleamine 2,3-dioxygénase (**IDO1**) ([Bessede et al., 2014](#)). Inversement, plusieurs métabolites de la KP (L-kynurénine (**L-kyn**), acide kynurénique (**KYNA**) et acide xanthurénique (**XANA**)) jouent un rôle dans l'homéostasie intestinale en activant le récepteur AhR.

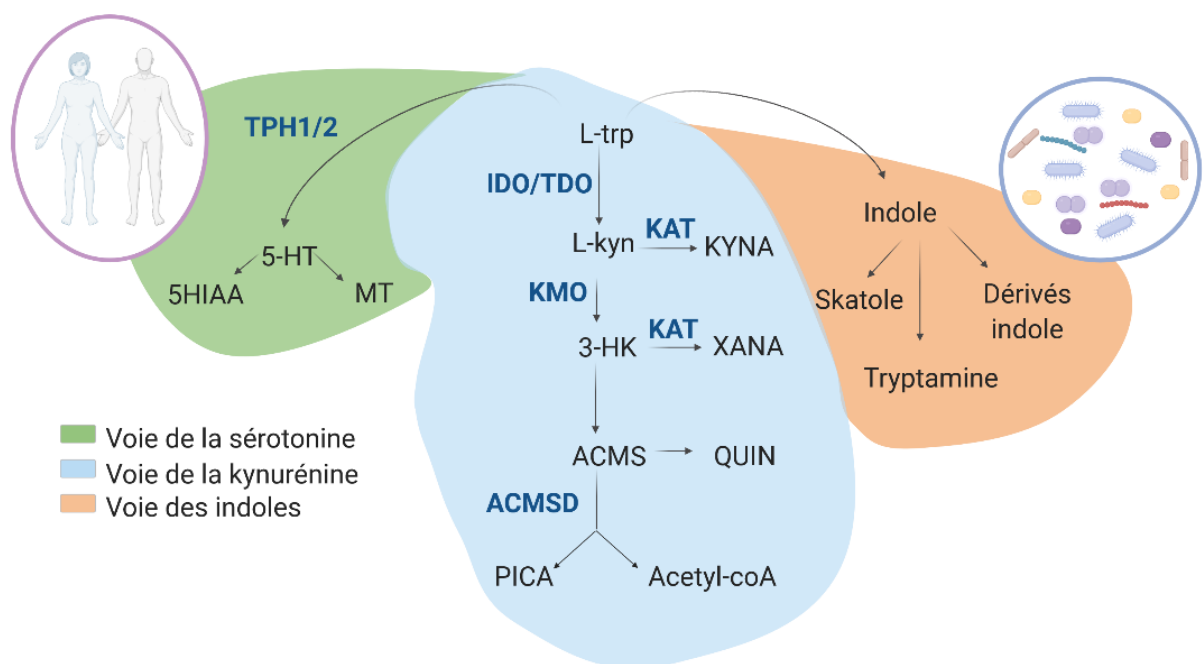


Figure 2 Métabolisme du L-trp. TPH1 : tryptophane hydroxylase ; 5-HT : sérotonine ; 5-HIAA : acide 5-hydroxyindole acétique ; MT : mélatonine ; L-trp : L-tryptophane ; IDO : indoleamine dioxygénase ; TDO : tryptophane dioxygénase ; KAT : kynurénine aminotransférase ; KYNA : acide kynurénique ; KMO : kynurénine monooxygénase ; XANA : acide xanthurénique ; ACMS : 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde ; QUIN : acide quinolinique ; ACMSD : 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdéhyde décarboxylase ; PICA : acide picolinique. Figure modifiée d'après Modoux et al (Modoux et al., 2021)

❖ Voie de la kynurénine

La KP représente la voie majoritaire de dégradation du L-trp chez l'Homme. Située au sein des cellules, la KP reste cependant sous la dépendance du microbiote intestinal (Dong et al., 2020). Le L-trp y est premièrement métabolisé par deux dioxygénases appelées TDO et IDO. TDO est une enzyme spécifique du L-trp, de localisation principalement hépatique et nécessaire au maintien de la concentration physiologique du L-trp. IDO1 est une enzyme non spécifique du L-trp, localisée au niveau des cellules épithéliales des barrières et du système immunitaire et qui prend le relais de TDO en contexte inflammatoire (Badawy, 2017). Le microbiote intestinal est un moteur connu de l'expression d'IDO1 et il a également été démontré que l'activité d'IDO1 régule la composition du microbiote (Krautkramer et al., 2020; Zelante et al., 2013). Cette première étape aboutit à la synthèse de L-kyn qui peut ensuite être métabolisée par l'enzyme kynurénine aminotransférase (**KAT**) pour produire KYNA, un métabolite endogène synthétisé sous la dépendance du microbiote (Dong et al., 2020) et dont il n'existe aucune enzyme catabolique ou mécanisme de recapture identifiés à ce jour. L-kyn peut aussi être métabolisée en 3-hydroxykynurénine (**3-HK**), précurseur de XANA par l'enzyme KAT, identique à celle synthétisant KYNA. La synthèse de XANA est également sous le contrôle du microbiote intestinal (Dong et al., 2020). Au-delà de la synthèse de XANA, 3-HK peut entrer dans une cascade métabolique qui aboutit *in fine* à la synthèse d'acide picolinique (**PICA**), d'acide quinolinique (**QUIN**) ou d'acétyl-CoA. L'enzyme 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdéhyde décarboxylase (**ACMSD**) joue un rôle homéostatique dans la synthèse de ces trois composés.

❖ Voie de la sérotonine

La 5-HT est un neurotransmetteur qui joue un rôle important dans la régulation de divers processus physiologiques dans le cerveau et l'intestin. Dans le tractus gastro-intestinal, la 5-HT module la sécrétion et l'absorption d'électrolytes, la perception des nausées ou de la douleur ainsi que la motilité intestinale. Le tractus gastro-intestinal est une source primordiale de 5-HT puisque 95% de la 5-HT y est synthétisé par des CEIs spécialisées appelées CECs ([Krautkramer et al., 2020](#)). La synthèse intestinale de 5-HT est sous la dépendance de l'enzyme tryptophane hydroxylase (**TPH**) 1, du microbiote intestinal et des AGCCs ([Reigstad et al., 2015](#); [Yano et al., 2015](#)).

❖ Voie des indoles

Le L-trp non absorbé est métabolisé par le microbiote intestinal en divers dérivés à structure indole dont certains possèdent la capacité de se lier et d'activer le récepteur AhR. Cette voie des indoles-AhR est contrôlée en partie par le génotype de l'hôte. Lamas et al. ont ainsi constaté que le microbiote des souris déficientes dans le domaine de recrutement des caspases 9 (CARD9) ne parvenaient pas à métaboliser le L-trp en métabolites ligands de AhR ([Lamas et al., 2016](#)). Ces souris Card9 ^{-/-} avaient des niveaux réduits de bactéries avec des fonctions de catabolisme du L-trp telle que *Lactobacillus reuteri* ([Zelante et al., 2013](#)), et étaient plus sensibles à l'inflammation intestinale. Ces métabolites du L-trp dérivés du microbiote et actifs sur AhR comprennent à ce jour l'indole, l'indole 3 aldéhyde (**IAld**) ([Vyhlídalová et al., 2020](#); [Zelante et al., 2013](#)), l'acide indole acétique (**IAA**) ([Jin et al., 2014](#); [Lamas et al., 2016](#)), l'indole 3 sulfate ([Jin et al., 2017](#); [Schroeder et al., 2010](#)), la tryptamine ([Gao et al., 2018](#); [Jin et al., 2014](#)) et le skatole

(Hubbard et al., 2015; Stepankova et al., 2018). L'indole (Thaiss et al., 2016) et l'acide indole propionique (**IPA**) (Nematollahi et al., 2016) activent également le récepteur PXR pour renforcer les jonctions serrées au niveau des cellules épithéliales et pour réduire l'inflammation intestinale (Venkatesh et al., 2014).

3. Altérations pathologiques du microbiote

La dysbiose fait référence à la perturbation de l'interaction dynamique entre l'hôte son microbiote causée par des altérations quantitatives, qualitatives ou fonctionnelles de ce dernier. On peut retrouver par exemple une réduction des espèces bénéfiques et anti-inflammatoires (comme *Faecalibacterium prausnitzii* et *Akkermansia muciniphila*) ou la colonisation de bactéries pro-inflammatoires (comme *Bacteroides thetaiotamicron*, *Ruminococcus gnavus* et *Escherichia coli*) (Brown et al., 2013; Thaiss et al., 2016). Les maladies inflammatoires, les troubles métaboliques, l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires ont été associées à une dysbiose bactérienne spécifique (Thaiss et al., 2016). Compte tenu des redondances fonctionnelles observées entre les microorganismes, la dysbiose peut être qualifié de dysmétabolose (perturbation dans la synthèse des métabolites) responsable d'une rupture de la symbiose entre le microbiote et son hôte. On note par exemple une diminution des espèces productrices de butyrate dans le diabète de type 1, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**MIC**), l'arthrite, ou encore l'allergie (Tan et al., 2014). Le métabolisme du L-trp est également perturbé dans plusieurs pathologies associées à une dysbiose intestinale (Agus et al., 2018, 2021; Lamas et al., 2020). Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle dans l'émergence d'un état dysbiotique comme le mode d'accouchement (césarienne ou voie basse), l'allaitement maternel, la prise d'antibiotiques, le mode de vie et plus

particulièrement l'alimentation, le stress ou encore la pratique d'une activité sportive. Compte tenu de l'importante synthèse de ligands AhR dérivés du L-trp par le microbiote, cette dysbiose a des répercussions sur la signalisation médiée par AhR.

II. RECEPTEUR AUX ARYL HYDROCARBURES

Le récepteur AhR est codé par un gène retrouvé chez divers animaux tels que les nématodes (*Caenorhabditis elegans*), les mollusques (par exemple *Mytilus edulis*), les mouches des fruits (*Drosophila melanogaster*) et tous les chordés, indiquant que le gène ancestral de la protéine AhR était présent il y a au moins 550 millions d'années, avant la divergence évolutive (Hahn, 2002). Les premières études axées sur le récepteur AhR ont été menées pour comprendre les mécanismes à l'origine de la toxicité médiée par son ligand prototypique appelé 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-dioxine (**TCDD**) (Stockinger et al., 2021). Longtemps cantonné au domaine de la toxicologie, AhR s'est révélé par la suite être impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement des ovocytes, des vaisseaux sanguins, des cardiomyocytes, des cellules souches hématopoïétiques, du système immunitaire intestinal et de la barrière épithéliale intestinale mais également dans le développement et la fonction de diverses cellules immunitaires ainsi que dans la réparation tissulaire cutanée après exposition aux UVB (Wang et al., 2021). AhR possède une expression constitutive élevée au niveau du foie et des barrières de l'organisme (peau, poumons, intestins). Il est en revanche assez peu présent au niveau des lymphocytes T naïfs, les lymphocytes T helper (**TH**) TH1 et TH2 ainsi que dans les cellules B naïves (Esser and Rannug, 2015).

1. Structure

AhR appartient aux facteurs de transcription appelés bHLH-PAS, une sous-famille de la classe des protéines bHLH impliquée dans des processus biologiques fondamentaux comme la différenciation et le maintien du cycle cellulaire, le rythme circadien, les

gradients d'oxygène ou la réponse aux xénobiotiques (Stockinger et al., 2014). bHLH est le motif de base « hélice-boucle-hélice » impliqué dans la liaison à l'ADN et les interactions entre protéines (Stockinger et al., 2014). Le domaine PAS est commun à de nombreuses protéines intervenant dans la détection et l'adaptation aux changements environnementaux. L'acronyme « PAS » provient de la première lettre de chacun des 3 membres fondateurs de la famille : PER, ARNT et SIM. Il est composé de deux répétitions structurales appelées PAS A et PAS B impliquées dans la formation d'hétérodimères (notamment avec le partenaire ARNT) et la liaison du ligand (Stockinger et al., 2014). Le domaine C-terminal permet quant à lui l'interaction avec les coactivateurs et les corépresseurs de AhR. Enfin, AhR possède à la fois un signal de localisation nucléaire et un signal d'exportation nucléaire, qui jouent tous deux un rôle important dans la translocation et la distribution intracellulaire de la protéine (Puga et al., 2009).

Dans son état latent (sans liaison à l'ADN), AhR est retrouvé au niveau du cytoplasme, associé de manière stable à deux protéines du choc thermique Hsp90, à la protéine p23 et à la protéine XAP2. XAP2 et p23 permettent la rétention cytoplasmique de AhR et empêche sa translocation et son interaction non spécifique avec **ARNT** (translocateur nucléaire de AhR – « AhR nuclear translocator ») en absence de ligand (Stockinger et al., 2021).

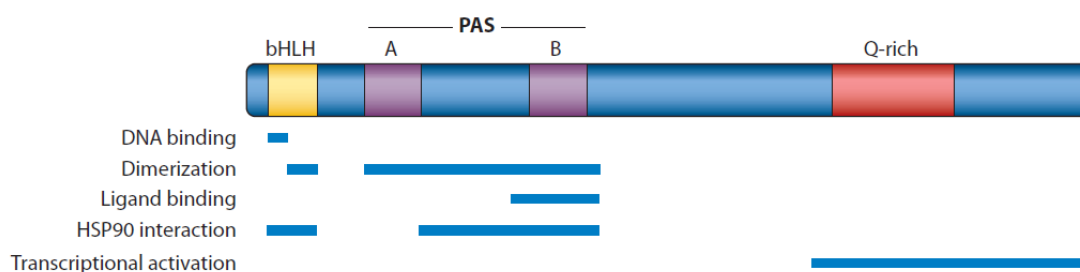


Figure 3 Structure de la protéines AhR d'après Stockinger et al (Stockinger et al., 2014)

2. Mécanisme d'activation

2.1. Activation, translocation et dimérisation

Après fixation du ligand sur AhR, le couple ligand-AhR transloque du cytoplasme au noyau. S'en suit une dissociation des protéines chaperonnes et une dimérisation avec la protéine ARNT ([Stockinger et al., 2014](#)). L'hétérodimère AHR-ARNT se lie ensuite aux promoteurs de gènes cibles portant des séquences appelées éléments de réponse aux xénobiotiques (**XREs**) ou aux dioxines (**DREs**) et caractérisées par la séquence consensus 5'-(C)GCGTG-3' ([Wang et al., 2021](#)). La fixation du dimère au niveau de ces séquences est responsable de l'induction transcriptionnelle des gènes cibles après recrutement de différents coactivateurs ([Stockinger et al., 2014](#)).

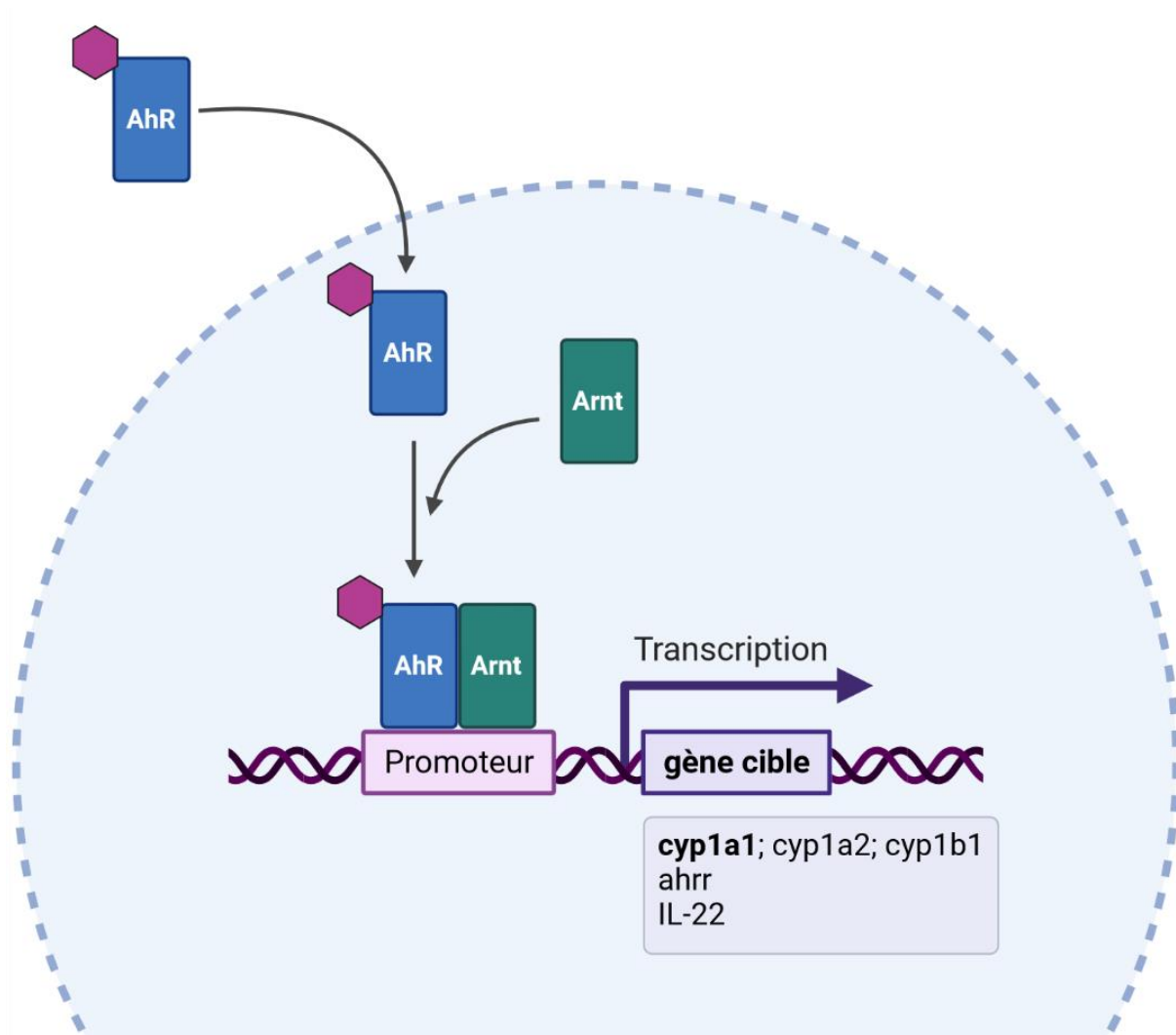


Figure 4 Mécanisme d'action du récepteur AhR après fixation du ligand

2.2. Transcription des gènes cibles

Les gènes cibles de AhR comprennent des enzymes de phase 1 (cytochromes (**CYP**), et plus particulièrement la famille CYP1), des enzymes de phase 2 (UDP-glucuronosyl transférase ((**UGT**)1A1) et glutathion S-transférase (**GST**)) du métabolisme des xénobiotiques, l'interleukine 22 ainsi que le répresseur de AhR appelé **AhRR** (Lamas et al., 2018; Puga et al., 2009).

2.2.1. Cytochromes de classe 1

Les enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques comprennent la superfamille des monooxygénases héminiques CYP P450 que l'on retrouve principalement au niveau du foie, du tractus gastrointestinal, des poumons et des reins. Ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme de différentes substances et représentent un mécanisme de défense cellulaire essentiel de la cellule. Parmi les 18 familles de CYP, celle du CYP1 est sous le contrôle de AhR et métabolise certains ligands de AhR comme le benzo(α)pyrène, le 6-formylindolo [3,2-b] carbazole (**FICZ**), la bilirubine et la lipoxine A4 (Denison and Nagy, 2003; Guengerich, 2015; Wincent et al., 2012).

2.2.2. Enzymes de phase 2

Les enzymes de phase 2 du métabolisme des xénobiotiques sont impliquées dans la conjugaison des métabolites à des groupements polaires permettant leur excrétion dans les urines (Xu et al., 2005). On retrouve différentes enzymes comme la GST et les UGT qui sous la dépendance de AhR (Puga et al., 2009).

2.2.3. Interleukine-22

L'IL22 est une cytokine impliquée dans la réparation des tissus et la défense de l'hôte au niveau de la barrière épithéliale. Elle joue également un rôle dans l'homéostasie entre le système immunitaire et le microbiote intestinal en régulant la composition de ce dernier (Dudakov et al., 2015). L'IL22 est une cytokine abondamment produite par les CLIs de

type 3, dont le maintien et la fonction sont sous la dépendance de AhR. Les dérivés du L-trp d'origine microbienne comme l'IAld induisent la transcription du gène de l'IL22 par un mécanisme dépendant de AhR ([Zelante et al., 2013](#)).

2.2.4. AhRR

AhRR est une protéine bHLH / PAS synthétisée sous la dépendance de AhR. AhRR peut s'hétérodimériser avec ARNT et se lier aux séquences XRE *in vitro*. Cette compétition avec AhR pour la liaison à ARNT bloque l'expression génique dépendante de AhR et forme une boucle de rétroaction négative sur la signalisation médiée par AhR ([Kewley et al., 2004](#)).

2.3. Extinction du signal activateur

Comme tout processus biologique, l'activation de AhR nécessite d'être régulée. Pour cela, trois mécanismes indépendants de rétroaction négative ont été décrits afin d'éviter les effets délétères potentiels d'une activation chronique ([Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018](#)).

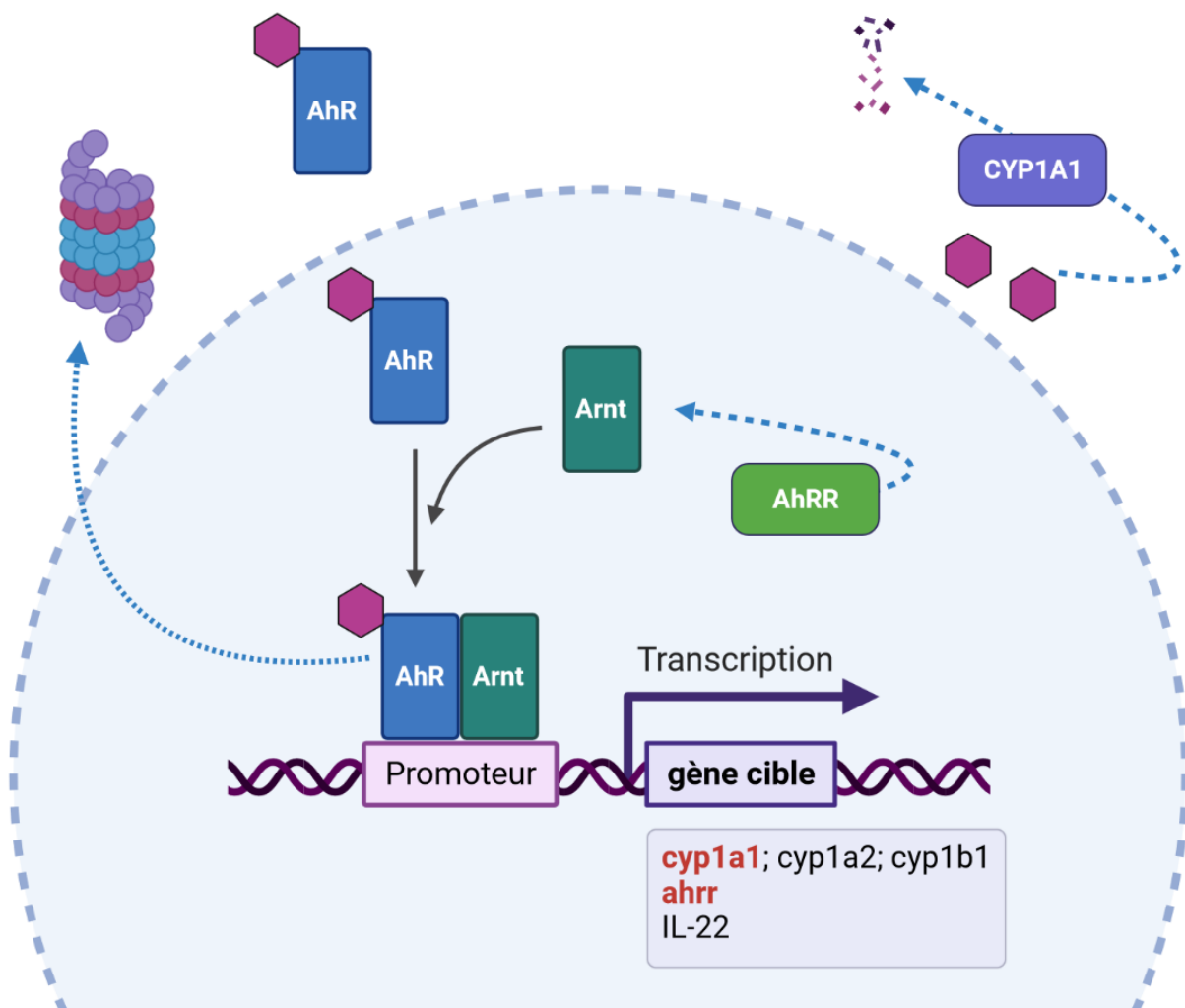


Figure 5 Mécanismes de rétroactivation négative du récepteur AhR

2.3.1. CYP1A1

La famille CYP1 métabolise certains ligands de AhR, et plus particulièrement les ligands endogènes comme FICZ (Schiering et al., 2017; Wincent et al., 2012) ou encore la 5-HT qui est à la fois un substrat et un inhibiteur du CYP1A1 (Manzella et al., 2020). La métabolisation du ligand entraîne son épuration du milieu cellulaire et un arrêt de l'activation de AhR. De nombreux xénobiotiques sont de mauvais substrats pour les

enzymes CYP1 et sont responsables d'une activation prolongée de AhR ([Stockinger et al., 2021](#)).

2.3.2. AHRR

La répression médiée par AhRR repose sur plusieurs hypothèses. La première repose sur une liaison de AhRR à ARNT empêchant le dimère AhR-ARNT de se former et de se fixer au niveau des promoteurs des gènes cibles. Ceci a été montré *in vitro* mais semble moins efficace *in vivo* ([Stockinger et al., 2021](#); [Vogel and Haarmann-Stemmann, 2017](#)). Une autre hypothèse repose sur une modification post-traductionnelle par un processus de SUMOylation permettant de recruter des corépresseurs et des HDACs au niveau des promoteurs contenant des DREs. La condensation locale de la chromatine abrogerait ainsi la transcription des gènes cibles de AhR sans nécessité de compétition pour la fixation à ARNT ([Vogel and Haarmann-Stemmann, 2017](#)).

2.3.3. Protéasome

La voie de l'ubiquitine protéasome a été découverte dans les années 1980. Il s'agit du plus important système régulé de dégradation des protéines intracellulaires. Cette voie est impliquée dans des processus tels que l'apoptose, la survie cellulaire, la progression du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la présentation de l'antigène, entre autres ([Manasanch and Orlowski, 2017](#)). Les composants de ce système agissent de manière hautement coordonnée à travers différentes étapes qui incluent la polyubiquitylation, la déubiquitynilation et la dégradation de la protéine cible ([Pollenz, 2002](#)). De tous les

inhibiteurs de protéase testés (calpaïnes, sérine/thréonine protéase, sérine protéase, protéases lysosomales), seuls les inhibiteurs du protéasome 26S se sont montrés efficaces pour inhiber la dégradation de AhR ([Pollenz, 2002](#)). Des données *in vitro* confirment une disparition de la protéine AhR suite à l'exposition au ligand, de manière indépendante d'une baisse de la transcription ([Pollenz, 2002](#)).

3. Ligands de AhR

Le TCDD et les autres polluants environnementaux hydrophobes ont été les premiers décrits comme ligands AhR. Par la suite, l'implication de AhR comme un régulateur de l'homéostasie a conduit à une identification de ligands physiologiques endogènes et alimentaires.

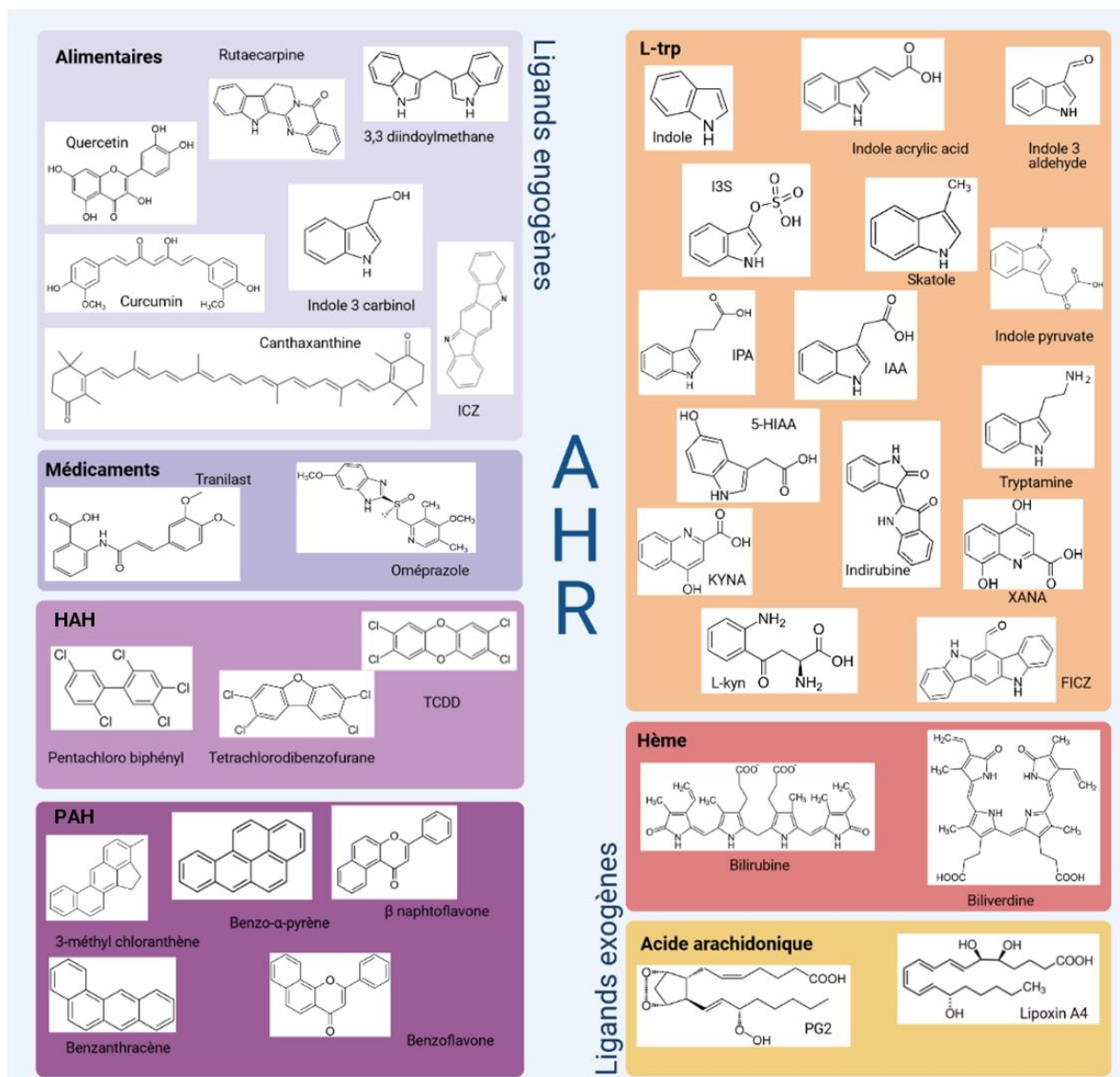


Figure 6 Ligands AhR. ICZ : indolo [3,4-b] carbazole ; TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ; PAH : hydrocarbure aromatique polycyclique ; HAH : hydrocarbure aromatique halogéné ; L-trp : L-tryptophane ; I3S : indoxyl-3-sulfate ; IAA : acide indole acétique ; 5-HIAA : acide 5-hydroxyindole acétique ; KYNA : acide kynurénique ; XANA : acide xanthurénique ; L-kyn : L-kynurénine ; FICZ : 6-formylindolo [3,2-b] carbazole

3.1. Ligands exogènes

3.1.1. Hydrocarbures aromatiques planaires et hydrocarbures aromatiques polycycliques

La majorité des ligands AhR exogènes caractérisés à ce jour font partie des hydrocarbures aromatiques halogénés (**HAH**) planaires (dont le ligand prototypique est le

TCDD) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (**HAP**) (qui regroupent le 3-méthylcholanthrène, le benzo(α)pyrène, et la β -naphthoflavone) (Bohonowych and Denison, 2007). Les HAHs sont métaboliquement stables c'est-à-dire que leur dégradation (par les CYP notamment) ne se fait que très lentement (Denison and Nagy, 2003). Les HAPs sont métaboliquement plus labiles et se lient avec une affinité relativement plus faible que les HAHs (Denison and Nagy, 2003).

3.1.2. Alimentaire

La plus grande source d'exposition des animaux et des humains aux ligands AhR (synthétiques et naturels) provient de l'alimentation. De nombreuses études ont décrit et caractérisé une large variété de molécules alimentaires capables d'agir sur AhR. On retrouve par exemple des glucosinolates dans la famille botanique des Brassicaceae (brocoli, chou-fleur, chou) qui, lors du contact avec le pH acide de l'estomac, subissent une condensation spontanée en l'indolo [3,4-b] carbazole (**ICZ**), un puissant agoniste AhR (Stockinger et al., 2014). De nombreux agonistes AhR se retrouvent également dans la famille des flavonoïdes (quercétine, diosmine, tangeritine, tamarixétine et galangine) et la plupart de ces molécules sont des substrats du CYP1A1 (Denison and Nagy, 2003; Murray et al., 2014).

3.2. Ligands endogènes

Une variété de molécules endogènes ayant la capacité de se lier à AhR et/ou d'induire l'expression de ses gènes cibles a été identifiée, possédant, pour la grande majorité, une affinité pour le récepteur largement plus faible que celle du TCDD. Chose nouvelle, ces

agonistes endogènes comprennent plusieurs classes structurellement distinctes (Denison and Nagy, 2003).

3.2.1. FicZ et dérivés

La découverte de FICZ fait suite à l'observation que l'illumination UV des milieux de culture tissulaire induisait une activation de AhR. FICZ est un produit chimique présentant une similitude structurelle significative avec le puissant ligand indole exogène ICZ (Rannug et al., 1995). FICZ a été détecté dans l'urine humaine (Wincent et al., 2012).

3.2.2. Métabolites de l'hème

La biliverdine et la bilirubine, toutes deux dérivées du métabolisme de l'hème peuvent induire l'expression du gène CYP1A1 et activer AhR sur un système rapporteur à une concentration physiologique. La bilirubine est également métabolisée par les enzymes dépendantes de AhR CYP1A1, CYP1A2 et UGT*01 (Denison and Nagy, 2003; Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018).

3.2.3. Métabolites de l'acide arachidonique

La lipoxine A4 et la prostaglandine G2, toutes deux métabolisées à partir de l'acide arachidonique, ont la capacité de se lier à AhR et d'activer l'expression des gènes cibles de manière transitoire. La lipoxine A4 est également métabolisée par le CYP1A1 (Denison and Nagy, 2003). Concernant les prostaglandines, leur activité sur AhR intervient à des

concentrations pharmacologiques pouvant être atteintes *in vivo*, notamment à proximité des hépatocytes (Denison and Nagy, 2003).

3.2.4. Métabolites du L-trp

Bien que le L-trp lui-même ne présente aucune capacité d'activer AhR, un certain nombre de ses métabolites sont reconnus comme ligands AHR. Certains sont produits par l'hôte (L-kyn (Seok et al., 2018), KYNA (DiNatale et al., 2010), XANA (DiNatale et al., 2010), acide 5-hydroxyindole acétique (**5-HIAA**) (Rosser et al., 2020)) mais la plupart proviennent de la métabolisation du L-trp par le microbiote intestinal (tryptamine (Jin et al., 2014), l'indole (Hubbard et al., 2015; Jin et al., 2014), 2-oxindole (Dong et al., 2020), 3-méthylindole (skatole) (Hubbard et al., 2015; Stepankova et al., 2018), IAA (Jin et al., 2014; Lamas et al., 2016), indole-3-pyruvate (**IPyA**), IAld (Zelante et al., 2013)).

4. AHR : rôle physiologique et pathologique

4.1. Organisation du système intestinal

Le contenu intestinal est séparé de l'intérieur du corps par une unique couche de CEIs surplombées par une couche de mucus. L'épithélium intestinal permet le passage des nutriments de la lumière dans la circulation sanguine et le mucus a des fonctions importantes dans la protection de l'intégrité de l'épithélium. Intercalés parmi les CEI, on retrouve des lymphocytes intra-épithéliaux (**LIEs**) qui interviennent en première ligne de défense (Esser and Rannug, 2015). Sous l'épithélium, on trouve le système immunitaire associé aux muqueuses et qui regroupe les ganglions mésentériques et les plaques de

Peyer. Ces structures s'organisent en follicules riches en lymphocytes T, B et en CD4. Les plaques de Peyer se retrouvent principalement dans l'iléon et sont les principaux sites inducteurs des réponses immunitaires muqueuses. On trouve également un système immunitaire diffus au niveau de la lamina propria. Celui-ci se compose des cellules immunitaires adaptatives et CLIs. Ces diverses populations immunitaires de l'intestin dépendent de la signalisation AhR pour leur émergence, leur entretien et leur fonctionnement.

4.2. Barrière intestinale

AhR est fortement exprimé au niveau des barrières de l'organisme tels que la peau, l'intestin et les poumons et possède la capacité à se lier à de nombreux composés exogènes et endogènes. Plusieurs travaux ont rapporté que les souris déficientes en AhR et soumises à un stress inflammatoire présentaient des défauts immunitaires au niveau de la peau, des poumons et du tractus digestif ([Gargaro et al., 2021](#)). AhR joue un rôle crucial dans le maintien du pool des LIEs et des CLIs, dans le contrôle de l'expression de protéines antimicrobiennes telles que la protéine 3 β dérivée de l'îlot de régénération (REG3 β) et REG3 γ des LIEs, dans la différenciation des cellules souches intestinales à partir des cryptes et la prolifération des cellules épithéliales, dans l'expression du récepteur de l'IL10 dans les CEIs, la tolérance immunitaire et dans la modulation de l'inflammation intestinale ([Denison and Nagy, 2003](#); [Li et al., 2011](#); [Rothhammer and Quintana, 2019](#); [Schiering et al., 2017](#)). L'homéostasie intestinale médiée par AhR repose en grande partie sur la production locale d'IL22 qui cible les cellules épithéliales pour la production de peptides antimicrobiens et qui régule également la réparation tissulaire ([Jin et al., 2014](#); [Lamas et al., 2016](#); [Zelante et al., 2013](#)). L'IL22 régule ainsi la composition

du microbiote ce qui permet de prévenir la colonisation par des microorganismes pathogènes tels que la levure *Candida albicans* (Romani et al., 2014; Zelante et al., 2013). En 2020, Yang et al ont montré que l'IL22 pouvait être induite par le butyrate via un mécanisme reposant à la fois sur AhR et sur HIF1a. Ceci permettait de protéger les souris lors de l'infection à *Citrobacter rodentium* et augmentait la clairance intestinale de la bactérie (Yang et al., 2020). Cette voie butyrate-IL22 s'est également montrée protectrice dans le modèle de colite au DSS (Yang et al., 2020).

4.3. Système immunitaire intestinal

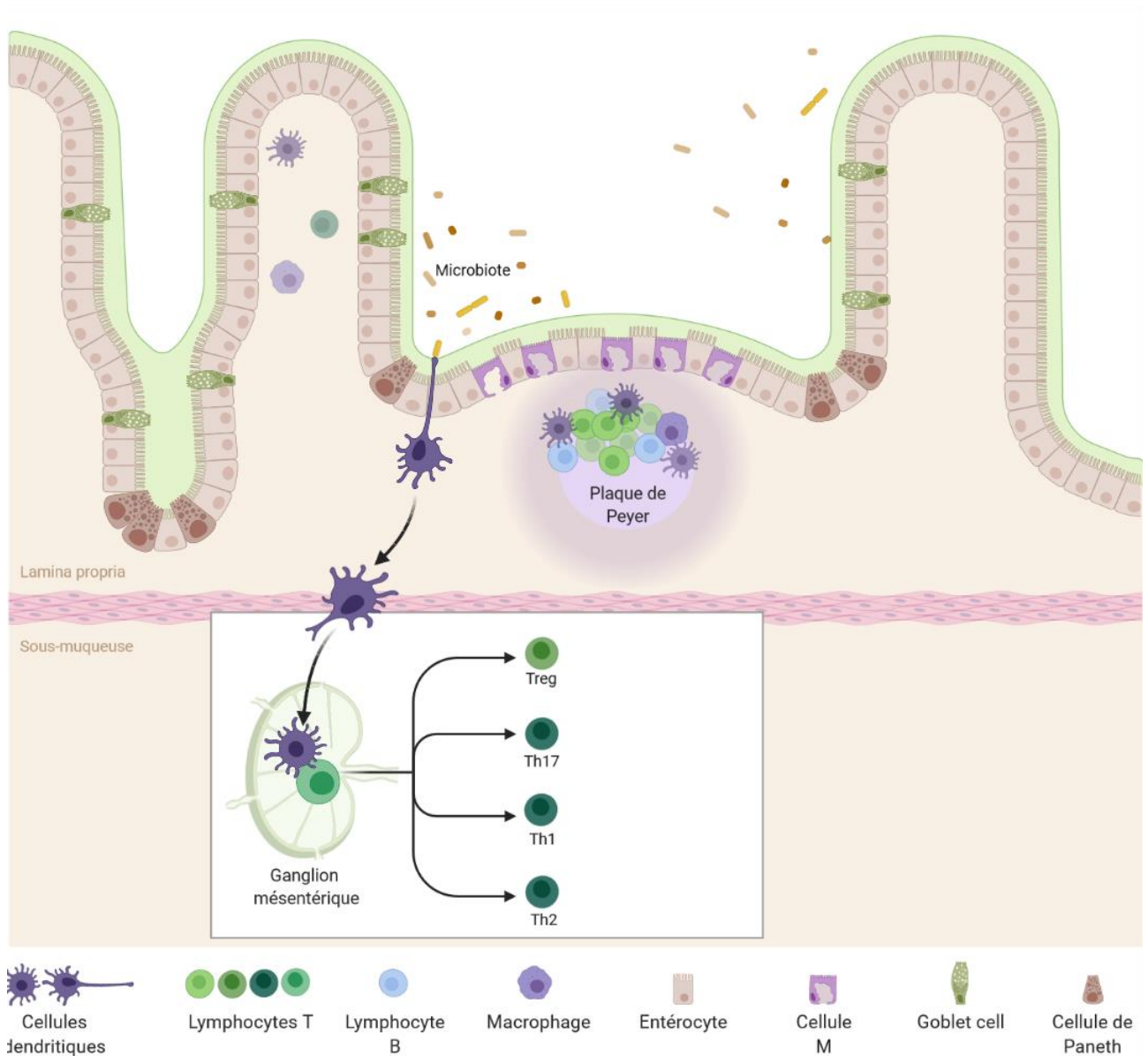


Figure 7 : Organisation du système immunitaire intestinal

4.3.1. Immunité innée

❖ Macrophages

L'expression de AhR dans les macrophages est essentielle pour l'homéostasie et la réponse inflammatoire. En 2018, Shinde et al ont montré que la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages active AhR par un mécanisme reposant sur la

détection de l'ADN de la cellule apoptotique par le TLR9. Ceci conduisait à la production de cytokines immunosuppressives comme l'IL10 limitant le développement de l'auto-immunité systémique chez la souris et l'homme. En l'absence de AhR, les macrophages co-cultivés avec des cellules apoptotiques switch de cette réponse anti-inflammatoire dominée par IL10 à un état pro-inflammatoire dominé par des niveaux élevés d'IL6, d'IL12p40 et de TNF α . (Shinde et al., 2018).

❖ Cellules dendritiques

Les CD sont des cellules présentatrices d'antigène qui font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, en particulier dans les sites de surface tels que la peau, les poumons et l'intestin, d'où elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour activer les lymphocytes T et B. Étant donné leur localisation, les CD sont des cibles idéales de l'exposition aux ligands de AhR environnementaux et endogènes (Rothhammer and Quintana, 2019). AhR contrôle à la fois la différenciation et la fonction des CD ce qui a un impact profond sur l'immunité des lymphocytes T puisque l'activation de AhR au niveau des CD stimule la différenciation des lymphocytes Tregs FoxP3⁺ et supprime les lymphocytes T effecteurs (Fallarino et al., 2006; Mucida et al., 2007) par un mécanisme dépendant notamment de la production d'acide rétinoïque (Quintana et al., 2010). Au niveau intestinal, la présence de AhR au niveau des CD est nécessaire à la morphogénèse normale et à la prolifération et différenciation des cellules de Paneth et de goblet cells (Chng et al., 2016).

❖ Cellules lymphoïdes innées

Les CLIs du tractus gastro-intestinal dépendent de AhR et jouent un rôle clef dans la barrière muqueuse par leur sécrétion l'IL-22 ([Qiu et al., 2012](#); [Zelante et al., 2013](#)).

4.3.2. *Immunité adaptative*

❖ Lymphocytes T et B

L'expression de AhR varie au sein du sous ensemble des cellules T helper. On y retrouve une expression élevée dans les cellules TH17 et les cellules Tregs alors qu'elle est faible voire négligeable dans les cellules T CD4+ naïves, les cellules TH1 et les cellules TH2 ([Rothhammer and Quintana, 2019](#)). L'activation de AhR au niveau des lymphocytes médie la plupart du temps des effets antiinflammatoires en supprimant les lymphocytes TH et en favorisant la différenciation des lymphocytes Tregs. Cependant, Quintana et al ont été les premiers à montrer que la balance entre le développement des TH17 et celui des Tregs dépendait de la nature des ligands AhR ([Quintana et al., 2008](#)). Alors que le TCDD et l'ITE induisait les Treg, l'agoniste endogène FICZ faisait pencher la balance du côté des TH17, aggravant de ce fait l'encéphalite expérimentale chez la souris. Par la suite, cette équipe a pu montrer que l'agoniste de AhR ITE agissait à la fois sur les CD4 et les cellules T et induisait un phénotype tolérogène des CD4, une induction de la différenciation des Treg périphériques (mais pas thymiques) dépendante de l'acide rétinoïque et une protection des souris envers l'encéphalite auto-immune ([Quintana et al., 2010](#)). Ces données mettent fortement en évidence le rôle du microenvironnement tissulaire dans le conditionnement du résultat de l'activation de l'AhR dans des cellules immunitaires spécifiques.

Au niveau des lymphocytes B, l'expression de AhR varie au cours des différentes étapes de leur différenciation. AhR contrôle leur prolifération, induit leur différenciation en cellules B régulatrices et inhibe leur différenciation en cellules B inflammatoires ([Gargaro et al., 2021](#); [Piper et al., 2019](#)).

❖ Lymphocytes intra-épithéliaux

Les LIEs représentent une population hétérogène de cellules T résidant dans l'épithélium de l'intestin et de la peau. Au niveau intestinal, ces cellules sont essentielles pour maintenir l'intégrité des surfaces muqueuses et protéger l'épithélium contre les pathogènes ou les pathologies d'origine immunitaire ([Shinde and McGaha, 2018](#)). AhR est fortement exprimé dans certaines sous populations de LIEs. Au niveau intestinal, ces cellules sont les principales productrices d'IL22 et sont nécessaires au maintien de certaines populations de lymphocytes ([Shinde and McGaha, 2018](#)).

4.4. AhR et pathologie : implications dans les MICI

Plusieurs études font le lien entre une dérégulation de la voie AhR (et du métabolisme du L-trp en général) et les MICI. Dans les modèles de colite expérimentale, on observe par exemple une diminution de l'expression de AhR au niveau du colon, notamment au niveau des cellules épithéliales et des cellules mononuclées de la lamina propria ([Monteleone et al., 2011](#)) et l'absence de AhR aggrave la colite ([Gao et al., 2018](#)). De façon semblable, une diminution significative de l'expression de AhR est observée chez les patients atteints de maladie de Crohn (**MC**) par rapport aux témoins sains et aux patients atteints de RCH (n = 10 pour MC et 10 pour RCH) ([Monteleone et al., 2011](#)). Chez ces patients, on note également une diminution significative des taux sériques de L-trp (plus prononcée chez les patients atteints de MC versus RCH) ([Nikolaus et al., 2017](#)) et des métabolites du L-trp activant AhR comme IAA (selles) ou IPA (sérum) ([Alexeev et al., 2018](#); [Lamas et al., 2016](#)). L'activation de AhR semble donc plutôt bénéfique dans ces pathologies. Cela a été montré *in vivo* où l'activation de l'AhR induite par le TCDD diminuait la létalité et la gravité des symptômes dans la colite expérimentale chez la souris ([Takamura et al., 2010](#)). Des résultats similaires ont été obtenus en administrant par voie orale des ligands endogènes de AhR comme l'indole et l'IPA ([Alexeev et al., 2018](#); [Whitfield-Cargile et al., 2016](#)), des souches bactériennes productrices de ligands AhR ([Lamas et al., 2016](#); [Li et al., 2021](#); [Takamura et al., 2011](#)) ou encore des molécules modulant la composition du microbiote en faveur des espèces productrices de ligands de AhR ([Jing et al., 2021](#)).

Contexte scientifique et objectifs des travaux

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX

Placé à l'interface entre l'hôte et le microbiote, AhR présente un fort potentiel thérapeutique dans les maladies inflammatoires. Décoder les mécanismes de son activation et de sa régulation par les métabolites du microbiote est crucial pour comprendre les conséquences des dysbioses qui font le lit de nombreuses pathologies. Différents métabolites ont été investigués de manière isolée pour leur capacité à activer AhR mais aucune étude ne s'est penchée sur leur combinaison, pourtant reflet de la complexité de l'environnement intestinal.

L'objectif global de ce projet de thèse est d'étudier les interactions de différentes classes de métabolites bactériens au niveau de AhR. Il s'agira ensuite de décrypter les mécanismes sous-jacents qui entrent en jeu dans la communication entre l'hôte et son microbiote via l'activation de AhR.

1. Quelles sont les conséquences de la combinaison de plusieurs métabolites bactériens sur le récepteur AhR ?

Pour obtenir une image globale de la capacité des métabolites dérivés du microbiote à activer AhR, nous avons criblé cinquante-huit métabolites dépendants du microbiote intestinal sur un système rapporteur. Les métabolites dérivés du L-trp et les AGCCs butyrate et propionate activaient le plus fortement AhR sur les cellules hépatiques rapportrices humaines HepG2^{luc}. Nous avons ensuite évalué l'effet des meilleurs résultats de ce premier criblage dans une lignée de CEIs rapportrices humaines HT29^{luc}. La plupart

des métabolites activant AhR dans HepG2^{luc} étaient également efficaces dans HT29^{luc} et le butyrate était également le plus puissant sur ces cellules.

2. Quels sont les mécanismes sous-jacents à l'activation de AhR en présence de la combinaison des métabolites du L-trp et des AGCCs ?

Dans cette seconde partie, nous avons exploré différents mécanismes qui peuvent expliquer la synergie observée sur l'activation de AhR en présence de butyrate. Nous avons tout d'abord évalué si le butyrate possédait la capacité de se fixer au récepteur. Nous avons également évalué l'action du butyrate sur la cascade d'activation de AhR, allant de la translocation nucléaire à la dégradation de la protéine AhR par le CYP et le protéasome. Enfin, nous avons exploré les cibles du butyrate qui auraient pu agir indirectement sur AhR à savoir les RCPGs ainsi que les enzymes HDAC et HAT.

Résultats expérimentaux

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Manuscrit n°1 • Butyrate acts through HDAC inhibition to enhance aryl hydrocarbon receptor activation by gut microbiota-derived ligands

Annexe I

Authors : Morgane Modoux^{1,2}, Nathalie Rolhion^{1,2}, Jeremie H. Lefevre^{2,3}, Cyriane Oeuvray^{1,2}, Petr Nádvořík⁴, Peter Illes⁴, Patrick Emond⁵, Yann Parc³, Sridhar Mani⁶, Zdenek Dvorak⁴, Harry Sokol^{1,2,7*}

1 Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Gastroenterology Department, F-75012 Paris, France

2 Paris Centre for Microbiome Medicine (PaCeMM) FHU, Paris, France

3 Sorbonne Université, Department of Digestive Surgery, AP-HP, Hôpital Saint Antoine, F-75012, Paris, France

4 Departments of Cell Biology and Genetics, Palacký University, Olomouc 78371, Czech Republic.

5 UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, Centre-Val de Loire, France.

6 Departments of Molecular Pharmacology, Genetics and Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

7 INRAe, UMR1319 Micalis & AgroParisTech, Jouy en Josas, France

Introduction

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe essentiel à la défense de l'hôte contre les infections, au métabolisme des nutriments et à la réparation des tissus. Le microbiote intestinal lui-même et ses métabolites modulent la machinerie enzymatique de l'hôte de manière transversale ([Atarashi et al., 2011](#) ; [Martin-Gallausiaux et al., 2018](#) ; [Reigstad et al., 2015](#) ; [Sayin et al., 2013](#) ; [Yano et al., 2015](#)). Les métabolites dérivés du microbiote sont produits (métabolites du L-tryptophane (L-trp), acides gras à chaîne courte (AGCCs)) ou transformés (acides biliaires secondaires) par le microbiote intestinal. Ils représentent un pivot central dans le dialogue hôte-microbiote et sont dérégulés dans plusieurs maladies, notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome métabolique et les affections neuropsychiatriques ([Agus et al., 2021](#) ; [Lavelle et Sokol, 2020](#) ; [Morais et al., 2021](#)). Parmi ceux-ci, la voie du récepteur aux aryl hydrocarbures (AhR) a gagné en intérêt ces dernières années en raison de son implication dans plusieurs processus métaboliques et immunitaires, tous deux vitaux pour l'homéostasie intestinale, ainsi que pour la coexistence optimale de l'hôte et de son microbiome ([Korecka et al., 2016](#)). D'abord caractérisé comme un récepteur pour les toxines environnementales, AhR est maintenant reconnu comme un récepteur pour de nombreux dérivés microbiens L-trp et émerge donc comme une cible pharmacologique attrayante pour plusieurs coïncidences telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la maladie cœliaque, le syndrome métabolique, les maladies hépatiques, les maladies neurologiques et les cancers ([Agus et al., 2018](#) ; [Lamas et al., 2016, 2020](#) ; [Modoux et al., 2021](#) ; [Natividad et al., 2018](#) ; [Wrzosek et al., 2021](#)).

AhR est membre de la famille des protéines bHLH-PAS. A l'état basal, AhR se situe dans le cytoplasme et transloque dans le noyau après avoir fixé un ligand. Dans le noyau, AhR se dimérise avec son partenaire AhR nuclear translocator (ARNT) avant que le dimère ne se lie à des séquences consensus situées sur le promoteur des gènes cibles, entraînant leur transcription et la production des protéines correspondantes. Les gènes cibles de l'AhR comprennent les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (cytochromes de classe 1 (CYP) : (CYP1a et CYP1b) et uridine diphosphate-glucuronyltransférase (UGT 1A1), la cytokine protectrice de la muqueuse intestinale IL22 et la protéine AhRR. Les enzymes CYP métabolisent les molécules en dérivés polaires et hydrosolubles qui sont ensuite conjugués par des enzymes de phase II (telles que l'UGT1A1), permettant leur détoxification et leur excrétion ([Mescher et Haarmann-Stemmann, 2018](#)). Au-delà des métabolites L-trp microbiens, AhR se lie à de nombreux ligands naturels ou synthétiques présentant une grande diversité structurale ([Denison et Nagy, 2003](#) ; [Marinelli et al., 2019](#)). Néanmoins, aucune étude n'a encore étudié systématiquement l'impact des métabolites microbiens dérivés de l'intestin sur l'activité AhR à ce jour.

Cette étude identifie le mécanisme épigénétique de régulation de AhR médié par le butyrate et transposable ex vivo sur des explants intestinaux humains. Plus généralement, elles soutiennent l'existence d'interactions complexes entre de multiples métabolites dérivés de l'intestin qui méritent une exploration approfondie.

Résumé des résultats

Des cinquante-huit métabolites criblés, les dérivés indole du L-trp et les AGCCs butyrate et propionate étaient les plus efficaces pour activer le récepteur AhR humain. Une analyse par métabolomique quantitative ciblée a confirmé la présence d'indoles dans le sérum de souris et le sérum humain ainsi que dans le sérum bovin fœtal (SBF) que nous avons utilisé pour nos expériences. Alors que la plupart des dérivés indoles conservait une activité sur AhR en l'absence de SBF, ce n'était pas le cas du butyrate. Cela nous a amené à investiguer son mécanisme d'action sur AhR. La combinaison du butyrate, du propionate ou de l'acétate avec des agonistes connus d'AhR comme FICZ et IAA conduisait à une activation synergique de AhR, à la fois sur un système rapporteur, sur des lignées cellulaires hépatiques et intestinales mais également sur des explants coliques sains de patients opérés pour un cancer colorectal. En plus de ne pas se lier à AhR, le butyrate n'avait aucun effet sur la translocation nucléaire de AhR et sur l'hétérodimérisation entre AhR et ARNT.

Nous avons montré dans un second temps que le butyrate n'agissait ni sur la dégradation du ligand par le CYP1A1, ni sur la dégradation de AhR par le protéasome. L'activation de AhR par le butyrate n'était pas non plus dépendante du récepteur HCAR2. L'utilisation d'un inhibiteur de HDACs mimait l'effet du butyrate dans l'augmentation de l'activité AhR induite par FICZ. De plus, le butyrate induisait le recrutement d'AhR au niveau du promoteur du gène *cyp1a1* de manière temps dépendante et la présence du butyrate augmentait également le recrutement de AhR induit par FICZ. Ensemble, ces résultats montrent que le butyrate agit en synergie avec les agonistes AhR grâce à son activité iHDAC en facilitant l'accès du complexe AhR à ses sites de liaison dans le promoteur des gènes cibles.

Discussion et perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Discussion et perspectives de mon travail de thèse

Le tractus gastro-intestinal représente surface d'absorption continuellement en contact avec des stimuli environnementaux, tels que les aliments, les xénobiotiques, les agents pathogènes et les métabolites issus du microbiote commensal. Plusieurs récepteurs ont été identifiés et décrits pour leur rôle dans le dialogue entre le microbiote intestinal et son hôte. Parmi ces récepteurs, AhR occupe une place importante en raison de sa liaison à de nombreux xénobiotiques et molécules endogènes. Les ligands AhR endogènes les mieux caractérisés restent à ce jour les métabolites dérivés du métabolisme du L-trp par l'hôte ou par son microbiote intestinal. L'ensemble de ces dérivés joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie intestinale et immunitaire ([Lamas et al., 2018](#)). Au-delà de ces dérivés du L-trp, les connaissances sur les ligands AhR produits par les bactéries restent limitées. Compte tenu de l'abondance et de la grande capacité métabolique du microbiote intestinal, il est probable que d'autres métabolites bactériens présents dans l'intestin puissent stimuler AhR de façon isolée ou combinée et d'avoir un impact sur la physiologie de l'hôte.

Dans ce contexte, mon travail de thèse visait à identifier les métabolites produits par le microbiote dotés d'une activité agoniste AhR. En criblant 59 métabolites dérivés du microbiote sur un système rapporteur AhR, nous avons identifié que certains dérivés indoles ainsi que les AGCCs butyrate et propionate étaient les activateurs les plus puissants de AhR sur deux lignées de cellules épithéliales hépatiques et intestinales humaines. Nous avons été surpris de constater que les dérivés indoles conservaient une

activité AhR en absence du sérum bovin fœtal utilisé dans le milieu de culture cellulaire alors que ce n'était pas le cas du butyrate. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'activation de AhR par ces deux classes de métabolites reposait sur des mécanismes différents. Une analyse métabolomique nous a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs dérivés indoles dont certains sont dotés d'une activité AhR à la fois dans le sérum bovin fœtal mais également dans le sérum murin et humain. Cette expérience rejoint les résultats précédemment publiés montrant que le sérum augmentait l'expression du *CYP1A1* sur les cellules Caco2 (N'Guyen et al., 2002). Ce résultat a son importance dans la suite du projet mais il pourrait également s'inscrire dans les résultats décevants obtenus lors de ma première année de thèse qui visait à étudier l'impact des métabolites du L-trp (dont certains ligands de AhR) sur la réponse inflammatoire de l'hôte. Dans ces expériences, nous avons utilisé du SBF dans le milieu de culture cellulaire ce qui a potentiellement pu interférer avec l'activation de AhR par les métabolites d'intérêt.

Les métabolites produits par le microbiote intestinal jouent un rôle fondamental dans la communication croisée entre le microbiote et l'hôte mais il est important de noter que tous ces métabolites sont présents ensemble dans la lumière intestinale, où ils peuvent interagir entre eux et avec les cellules de l'hôte (Krautkramer et al., 2020). L'activation de AhR par le butyrate en présence de SBF nous a conduit à penser que le butyrate nécessitait la présence de SBF, et donc des dérivés indoles présents, pour activer le récepteur. En combinant le butyrate avec certains métabolites endogènes du L-trp, nous avons pu montrer une synergie d'activation de AhR sur les cellules intestinales et hépatiques ainsi que sur les tissus intestinaux humains et des effets similaires ont été observés avec le propionate. L'acétate était quant à lui plus puissant sur les cellules hépatiques que sur les cellules intestinales ce qui semble logique puisque l'acétate est

généralement libéré dans la circulation sanguine via la veine porte et atteint le foie, tandis que le butyrate est principalement absorbé et métabolisé par l'épithélium colique ([Fellows et Varga-Weisz, 2019](#)).

Le butyrate a récemment été suggéré comme étant un ligand AhR selon une modélisation moléculaire *in silico* ([Marinelli et al., 2019](#)). *In vitro*, il a été montré que le butyrate mais aussi le propionate activaient AhR sur un système rapporteur ([Marinelli et al., 2019](#)) et amélioraient l'expression des gènes cibles *CYP1A1* et *AHRR* ([Jin et al., 2017](#)). En utilisant un test de déplacement de radio-ligand, méthode de référence pour étudier la liaison d'une molécule sur un récepteur donné, nous avons montré que ni le butyrate, ni le propionate ou l'acétate, ne se liaient à AhR. De plus, notre analyse n'a montré aucune autre caractéristique des ligands AhR pour le butyrate puisqu'il n'induisait ni la translocation nucléaire de AhR, ni la dimérisation avec ARNT ([Vyhliđalová et al., 2020](#)), confirmant ainsi que le butyrate n'agissait pas sur la cascade d'activation de AhR. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Rosser et al. qui ont montré que l'expression de AhR au niveau des cellules B était une condition nécessaire pour supprimer la maladie arthritique chez les souris supplémentées en butyrate sans que le butyrate ait un effet propre sur AhR ([Rosser et al., 2020](#)). Une explication possible soulevée par l'analyse de la composition du microbiote intestinal a révélé une augmentation de certains genres bactériens aptes à synthétiser des agonistes de AhR chez les souris supplémentées en butyrate par rapport aux souris témoins ([Gao et al., 2018](#); [Rosser et al., 2020](#)). Cette hypothèse semble également plausible lorsque les souris soumises à un régime riche en graisse sont supplémentées en prébiotiques comme l'inuline. Alors que le butyrate ne montrait pas d'effet propre sur l'amélioration du syndrome métabolique chez les souris, l'administration d'inuline modifiait la composition du microbiote et induisait l'expression

d'IL22 de façon dépendante du microbiote. L'activation de AhR n'a pas été étudiée dans cette étude mais il est possible d'imaginer une chaîne trophique dans laquelle l'inuline favoriserait la croissance de bactéries productrices de butyrate. Le butyrate synthétisé *in situ*, en plus de son effet synergique avec les agonistes AhR, favoriserait la croissance de bactéries productrices de ligands de AhR responsable de l'induction d'IL22 protectrice dans le syndrome métabolique (Zou et al., 2018). Cette hypothèse n'est pas plausible dans notre étude puisque notre approche a été exclusivement *in vitro*. En revanche, ce mécanisme amplificateur pourrait s'ajouter *in vivo* à la synergie obtenue par la combinaison du butyrate et d'un ligand AhR.

Au-delà de l'activation classique de AhR par un ligand, il existe plusieurs autres mécanismes d'activation indirects du récepteur. Les CYP de classe 1 dégradent de nombreux médicaments et certains ligands d'AhR comme le FICZ ou le benzo(α)pyrène (Guengerich, 2015 ; Wincent et al., 2012). La particularité des CYP1 est d'être induite par l'activation de AhR, permettant ainsi de créer une boucle de rétroaction négative lorsque AhR est activé par des ligands métabolisables. Ceci protège entre autres de l'activation chronique et délétère du récepteur impliquée dans des manifestations cliniques pathologiques. Plusieurs études ont rapporté que l'inhibition du CYP1a1 permettait de bloquer la dégradation d'agonistes puissants d'AhR comme FICZ, et donc d'augmenter l'activation d'AhR (Manzella et al., 2018, 2020 ; Schiering et al., 2017 ; Wincent et al., 2012). Ce mécanisme peut même conduire à catégoriser, à tort, des inhibiteurs du CYP1a1 comme des ligands de AhR. Ceci a été le cas pour la 5-HT, premièrement classée comme agoniste d'AhR en raison de sa capacité à induire l'expression du gène cible *CYP1A1* dans les lignées cellulaires Caco2 et T84 (Manzella et al., 2018). Par la suite, la 5-HT s'est révélée être un inhibiteur du CYP1a1 à la dose de 5μM (90%

d'inhibition) lui permettant d'empêcher sa métabolisation ainsi que celle de FICZ par le CYP1a1 (Manzella et al., 2020). Cette caractéristique d'inhibiteur du CYP1a1 lui donnait la particularité d'activer AhR seulement en présence d'un milieu cellulaire contenant du L-trp et d'augmenter l'expression du *CYP1A1* et *1B1* induite par FICZ (Manzella et al., 2020). Cela n'avait en revanche aucun impact sur l'activation de AhR par un ligand non métabolisé par le CYP1a1 comme le TCDD. Dans un essai acellulaire, nous avons montré que le butyrate n'inhibait par le CYP1a1 humain, contrairement à l' α -naphtoflavone, un inhibiteur du CYP1a1 reconnu. En revanche, la combinaison de la 5-HT et des AGCCs butyrate ou valérate conduisait à une synergie d'activation (**Figure 8**). Compte tenu de l'absence de SBF dans cette expérience, cette synergie ne reposait pas sur l'inhibition du métabolisme des dérivés indoles présents dans le sérum mais pourrait être expliquée par la présence d'un ligand de AhR métabolisable par le CYP1A1, comme FICZ, dans le milieu de culture cellulaire (Oberg et al., 2005). De ce fait, il est plausible que la combinaison d'un agoniste de AhR avec le butyrate et un inhibiteur de CYP1A1 augmente encore plus l'activation de AhR.

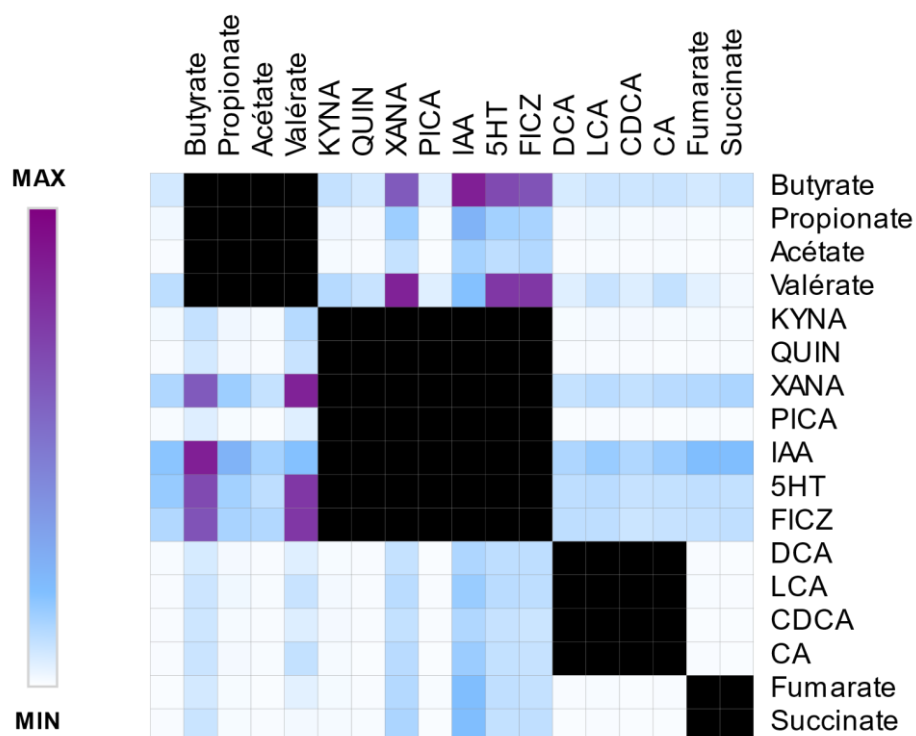


Figure 8 Effet de la combinaison de métabolites sur l'activation de AhR. Les cellules HepG2^{luc} 20 000 cellules/puit ont été traitées avec différentes doses de métabolites pendant 24H. L'activité AhR a été dosée dans le surnageant cellulaire par luminescence et les résultats ont été normalisés avec la valeur de la LDH. Les résultats ont ensuite été représentés sous forme de heat map en utilisant le logiciel Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>)
 KYNA : acide kynurénique ; QUIN : acide quinolinique ; XANA : acide xanthurénique ; PICA : acide picolinique ; IAA : acide indole acétique ; 5HT : 5-hydroxytryptamine ; FICZ : 6-formylindolo [3,2-b] carbazole ; DCA : acide déoxycholique ; LCA : acide lithocolique ; CDCA : acide chénodéoxycholique ; CA : acide cholique

Un autre mécanisme d'activation indirect repose non pas sur l'inhibition de la dégradation du ligand de AhR, mais sur l'inhibition de la dégradation de la protéine AhR elle-même. Comme beaucoup de molécules intracellulaires, AhR est dégradé par le protéasome (Ma and Baldwin, 2000). Il a été montré que l'inhibition du protéasome augmentait la quantité du complexe nucléaire AhR-ARNT et «superinduisait» l'expression du gène *CYP1A1* endogène par le TCDD (montré par une augmentation de la protéine CYP1A1), indiquant que la dégradation protéasomale de AhR servait de mécanisme de contrôle de l'activité du récepteur activé (Ma and Baldwin, 2000). Santiago-Josefat et al ont aussi montré que le traitement des cellules avec un inhibiteur du protéasome conduisait une activation de AhR puisque AhR transloquait dans le noyau, était capable de dimériser avec ARNT et

même d'activer la transcription de son gène cible *CYP1A2* en absence de ligand (Santiago-Josefat et al., 2001). Les auteurs ont relié cette activation de AhR avec l'expression de son partenaire ARNT dont l'expression était induite par l'inhibiteur du protéasome MG132. La même année, Yin et al ont montré que le butyrate agissait comme un inhibiteur modéré du protéasome avec une inhibition de l'ordre de 50% à la dose de 4mM sur les cellules HT29 (Yin et al., 2001). Dans notre étude, l'inhibiteur du protéasome MG132 ne parvenait pas à imiter les effets du butyrate sur l'activation de AhR. Nous avons étudié l'impact du butyrate sur l'expression de *AHR* et *ARNT* puisque ceci pourrait expliquer la formation d'un plus grand nombre de complexes AhR – ARNT et donc une liaison plus importante du complexe AhR-ARNT au niveau du promoteur de *CYP1A1*. Le butyrate n'induisait pas l'expression de *ARNT* sur les lignées cellulaire HT29 et HepG2 (**Figure 9**).

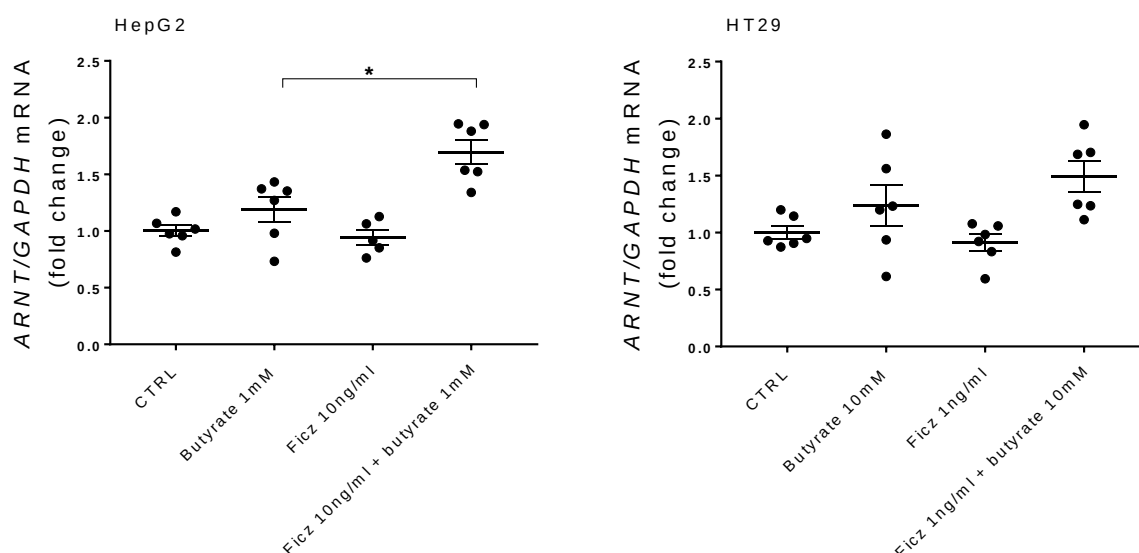


Figure 9 Impact du butyrate sur l'expression de *ARNT* après 8h (HepG2) ou 6h (HT29) de stimulation. Les cellules HepG2 ATCC et HT29 ATCC ont été mises en plaque (500 000 cellules/puit). Après une adhérence de 24h, les cellules ont été traitées en triplicat avec du butyrate 1mM (HepG2) ou 10mM (HT29), du FICZ 10ng/ml (HepG2) ou 1ng/ml (HT29) ou la combinaison du butyrate avec FICZ pendant 8h (HepG2) ou 6h (HT29). La quantification relative des niveaux d'ARNm de *ARNT* a été exprimée en utilisant la méthode 2- $\Delta\Delta C_t$ avec *GAPDH* comme gène de référence. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM de deux expériences indépendantes.

En revanche, nous avons retrouvé un résultat similaire à celui de Marinelli et al ([Marinelli et al., 2019](#)) montrant l'induction de l'expression de *AHR* en réponse au butyrate sur les lignées cellulaires HepG2 et HT29 (**Figure 10**). La pertinence de ce résultat dans la synergie observée nous semble peu plausible compte tenu de l'absence d'augmentation de formation du complexe AhR – ARNT par le butyrate dans notre étude de co-immunoprécipitation.

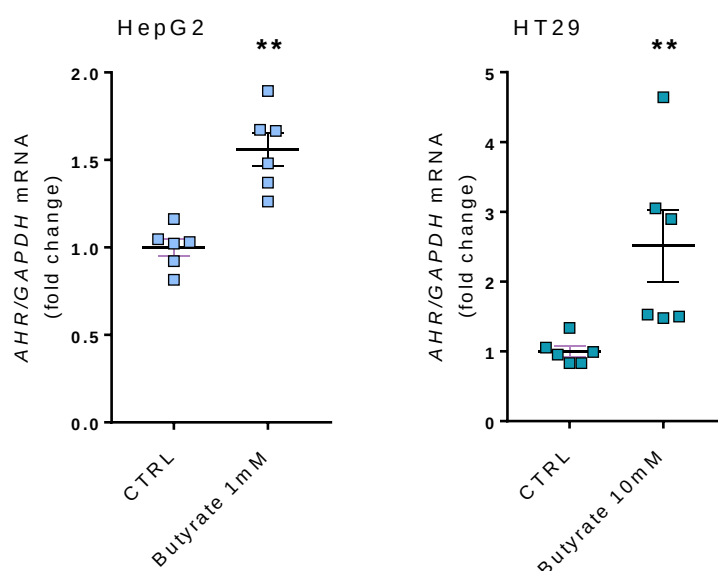


Figure 10 Impact du butyrate sur l'expression de *AhR* après 8H (HepG2) ou 6H (HT29) de stimulation. Les cellules HepG2 ATCC et HT29 ATCC ont été mises en plaques (500 000 cellules/puit). Après une adhérence de 24H, les cellules ont été traitées en triplicat avec du butyrate 1mM (HepG2) ou 10mM (HT29). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM de deux expériences indépendantes.

Un 3^{ème} mécanisme aurait pu reposer sur la répression de l'expression du répresseur de AhR, AhRR, par le butyrate. En inhibant l'expression de AhRR, ceci aurait empêché la compétition de AhRR et ARNT pour la fixation à AhR. Nous avons cependant montré une augmentation de l'expression de AhRR en réponse à la combinaison du butyrate avec

FICZ en comparaison à FICZ ce qui permet d'exclure ce mécanisme. L'ensemble de ces données nous a permis d'exclure les mécanismes indirects connus d'activation de AhR.

Le butyrate, le propionate et l'acétate se fixent sur des récepteurs membranaires avec des affinités variables. Alors que l'acétate et le propionate activent FFAR2 (Koh et al., 2016; Liu et al., 2020), le propionate et le butyrate activent FFAR3 (Koh et al., 2016; Poul et al., 2003) et seul le butyrate se fixe sur HCAR2. Seule l'expression de HCAR2 a été retrouvée, induite notamment par le butyrate sur les cellules HT29. En utilisant un inhibiteur de HCAR2, nous avons montré que ce récepteur n'était pas impliqué dans l'effet synergique observé entre les ligands AhR et le butyrate. De tous les AGCCs, HCAR2 ne lie que le butyrate, son ligand physiologique étant la niacine. La non implication de HCAR2 concorde avec nos observations que le propionate, et dans une moindre mesure l'acétate, sont également capable d'entrer en synergie avec les ligands AhR sur le système rapporteur exprimé dans les cellules HepG2 et HT29. Nous n'avons pas retrouvé d'expression de FFAR2 et de FFAR3 au niveau des lignées cellulaires hépatiques et intestinales HepG2 et HT29 contrairement aux travaux précédemment publiés (Mishra et al., 2020). Dans le doute, nous avons tout de même évalué l'implication de FFAR2 et FFAR3 sur les cellules HepG2^{luc}. L'utilisation de l'antagoniste de FFAR3 appelé GLPG0974 ne diminuait ni l'activation de AhR par le butyrate seul ou par la combinaison du butyrate avec FICZ (**Figure 11.A**). Compte tenu de l'absence de commercialisation d'un antagoniste de FFAR2, nous avons utilisé l'agoniste AR420625 mais cette molécule ne parvenait pas à mimer l'effet du butyrate sur l'activation de AhR médiée par FICZ (**Figure 11.B**). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les RCPGs liant les AGCCs ne sont pas impliqués dans la synergie d'activation de AhR par le butyrate combiné à

FICZ. Ces résultats concordent avec ceux de Marinelli et al montrant une non implication des RCPGs dans l'activation de AhR par le butyrate (Marinelli et al., 2019).

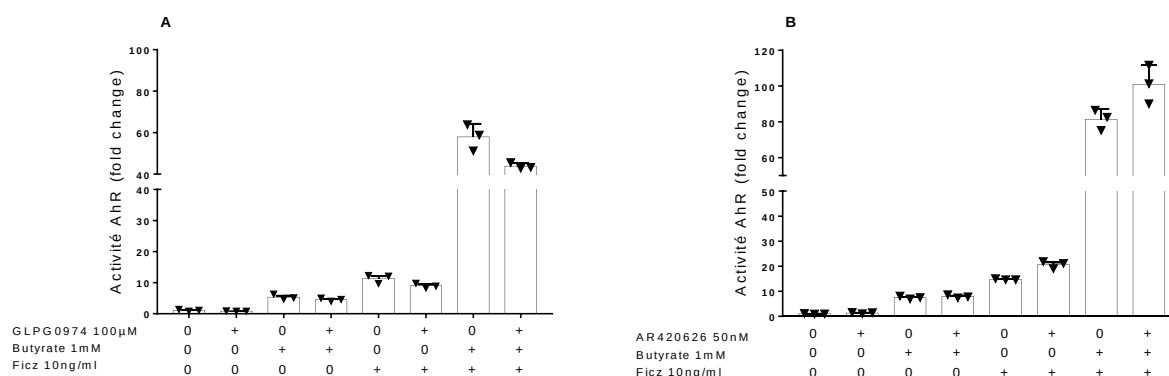


Figure 11 Impact de FFAR2 et FFAR3 sur l'activation synergique de AhR par la combinaison du butyrate et de FICZ. Les cellules HepG2^{luc} (20 000 cellules/puit) ont été traitées en triplicat pendant 24H avec du FICZ (10ng/ml), du butyrate (1mM) ou la combinaison du FICZ avec le butyrate en absence ou en présence de GLPG0974 (Biotechne, Cat.No.5621 ; 100µM) (**A**) ou de AR420626 (Biotechne, Cat.No.6163 ; 50nM) (**B**) dans un milieu sans SBF. L'activité AhR a été mesurée par luminescence dans le surnageant cellulaire et les résultats ont été normalisés avec la valeur de la LDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM d'une seule expérience.

Le butyrate agit à la fois sur les HDACs et les HATs, des enzymes impliquées dans les processus épigénétiques. Nous avons montré que le traitement des cellules par le butyrate entraînait une augmentation de la liaison de la protéine AhR au promoteur du gène cible humain *CYP1A1*. Des résultats similaires ont été observés précédemment dans la lignée cellulaire colique de souris (YAMC) (Jin et al., 2017), mais pas dans les cellules Caco2 (Jin et al., 2017) et Hepa-1 (Schnekenburger et al., 2007). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par une concentration plus élevée de SBF (20%) utilisée dans les cellules Caco2 par rapport aux cellules YAMC (5% de SBF seulement) et par un temps d'exposition qui pourrait être trop long (16H) par rapport aux données de la littérature pour les expériences dans les cellules Hepa-1. Alors que ces études n'ont pas rapporté d'augmentation du recrutement des AhR au niveau du promoteur *Cyp1a1* lorsque le butyrate est associé à des ligands AhR cancérigènes à haute affinité tels que

le TCDD ou le benzo(α)pyrène (Jin et al., 2017 ; Schnekenburger et al., 2007), nous avons constaté une augmentation du recrutement des AhR au niveau du promoteur de *CYP1A1* lorsque le butyrate est associé au ligand AhR endogène non toxique FICZ. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature du ligand puisque FICZ est un métabolite endogène métabolisé par le CYP1A1 contrairement au TCDD ou au benzo(α)pyrène qui sont des molécules toxiques très peu métabolisables.

Nous avons montré que l'iHDAC TSA récapitulait l'effet synergique du butyrate en présence d'un ligand AhR. Nous avons également montré que l'inhibition de HDAC par le butyrate n'entraînait pas l'activation des HATs, contrairement à ce qui a été publié précédemment, et donc que la synergie reposait uniquement sur l'inhibition de HDAC (Wu et al., 2018). Nous ne pouvons pas garantir que le butyrate agit uniquement par l'acétylation du promoteur puisque de nombreuses modifications épigénétiques telles que la propionylation, la butyrylation et la crotonylation reposent sur HDAC (Fellows et Varga-Weisz, 2019). Comme l'acétylation, la crotonylation se produit sur le groupe ϵ -amino des résidus lysine en y greffant une molécule de crotonyl-CoA et est sous la dépendance des HDACs de classe 1 et de l'HAT CBP/p300. Les plus hauts niveaux de crotonylation de histones ont été retrouvés dans le colon (Fellows et al., 2018) avec une baisse significative de ces niveaux de crotonylation lorsque les souris étaient traitées par antibiotiques, de manière parallèle à une baisse des AGCCs. Il a été montré que le butyrate favorisait la crotonylation des histones à des concentrations physiologiquement pertinentes *in vitro* (Fellows et al., 2018). D'autres iHDAC comme la TSA ou l'acide subéranilohydroxamique (SAHA) favorisaient également la crotonylation des histones *in vitro* de même que l'inhibiteur sélectif des HDACS de classe I appelé MS-275 (ou Entinostat) (Fellows et al., 2018). Une autre modification épigénétique est la méthylation

et il a été montré que la méthylation de l'ADN augmentait l'induction du *Cyp1* par le TCDD dans les cellules HeLa, mais pas dans les cellules MCF-7 ([Nakajima et al., 2003](#)). Comme le butyrate agit sur le processus de méthylation ([Chen et al., 2019](#)), il est envisageable que l'inhibition de la désacétylation des histones et la méthylation de l'ADN par le butyrate agissent de concert pour induire spécifiquement l'expression de la famille *Cyp1*.

Pour aller plus loin dans la compréhension des voies de signalisation impliquées, plusieurs hypothèses surgissent :

- Comment les AGCCs parviennent-ils jusqu'aux HDACs ?

Parmi les voies d'entrée possibles, il est connu que les AGCCs et le butyrate en particulier, utilisent des transporteurs membranaires pour pénétrer dans la cellule.

SMCT1 (aussi appelé SLC5A8) est un transporteur couplé au sodium que l'on retrouve à la surface des cellules épithéliales saines mais pas au niveau des cellules cancéreuses, où son expression est rendue impossible par méthylation ([Thangaraju et al., 2006](#)). Il a été montré que ce transporteur permettait le passage du pyruvate, du butyrate et du propionate, mais pas du lactate. Ces 3 molécules sont dotées d'une activité inhibitrice d'HDAC, en particulier sur HDAC1 et HDAC3, alors que le lactate ne possède aucune activité iHDAC. Dans une seconde étude, les auteurs ont montré que les cellules cancéreuses maintenaient de faibles niveaux de pyruvate et une absence d'expression de SMCT1 pour s'affranchir des effets pro apoptotiques de l'inhibition de HDAC1 et HDAC3 par le pyruvate ([Thangaraju et al., 2008](#)). Plus tard, SMCT1 a été impliqué dans l'inhibition de HDAC par le butyrate et le propionate ([Singh et al., 2010](#)). Les seuls inhibiteurs de SMCT1 connus à ce jour appartiennent à la classe des anti-inflammatoires non

stéroïdiens (AINS). Nous avons testé la capacité de l'ibuprofène à inhiber la synergie d'activation de la combinaison du butyrate et de FICZ sur le système rapporteur AhR.

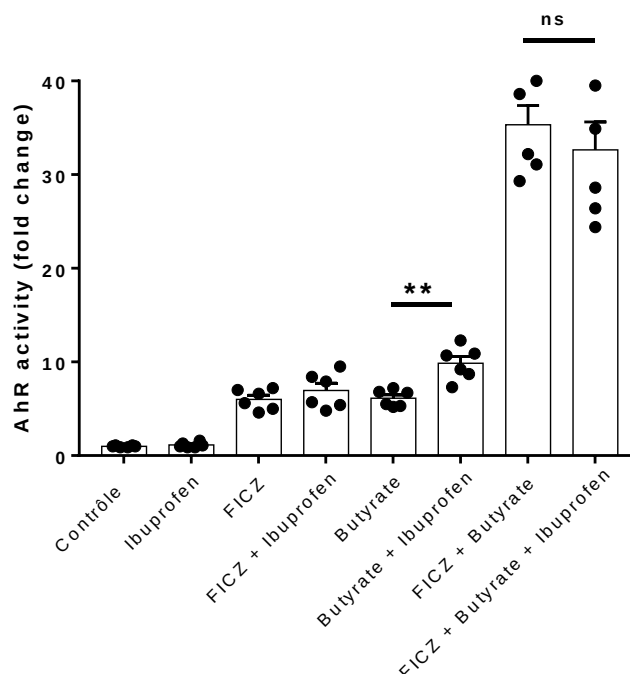


Figure 12 Impact de l'inhibition de SMCT1 par l'ibuprofène sur l'activation de AhR médiée par le butyrate et par FICZ. Les cellules HepG2^{luc} (20 000 cellules/puit) ont été traitées en triplicat pendant 24H avec du FICZ (10ng/ml), du butyrate (1mM) ou la combinaison du FICZ avec le butyrate en absence ou en présence d'ibuprofène (Sigma Aldrich, Cat.N°I4883 ; 100µM) dans un milieu sans SBF. L'activité AhR a été mesurée par luminescence dans le surnageant cellulaire et les résultats ont été normalisés avec la valeur de la LDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM de deux expériences indépendantes.

L'inhibition de SMCT1 par l'ibuprofène augmentait l'activation de AhR induite par le butyrate seul mais pas par FICZ mais n'avait aucun impact sur l'activation de AhR médiée par la combinaison du butyrate avec FICZ (**Figure 12**). Ces résultats montrent que SMCT1 n'est pas impliqué dans le mécanisme synergique d'activation de AhR. L'ibuprofène appartient à la classe des AINS. Cette classe pharmacologique comporte également d'autres molécules comme le sulindac et le diclofénac qui ont montré la

capacité de se lier à AhR et d'inhiber le CYP1A1 respectivement (Ciolino et al., 2006; Vincent et al., 2012). De ce fait, il est également possible que l'ibuprofène possède une activité intrinsèque sur AhR expliquant l'augmentation de l'activation du récepteur en présence de butyrate seul.

Un autre récepteur impliqué dans le transport des AGCCs est le récepteur MCT1 (aussi appelé SLC16A1). MCT1 est un transporteur des monocarboxylates couplé à l'ion H⁺. Il est considéré comme le principal transporteur responsable de l'absorption du butyrate dans les CEIs (Parada Venegas et al., 2019). Nous avons testé la capacité de l'acide para-chloromercuribenzoïque (pCMB), un inhibiteur de MCT1, à inhiber l'activation synergique de AhR par la combinaison du butyrate avec FICZ sur les cellules rapportrices HepG2^{luc}.

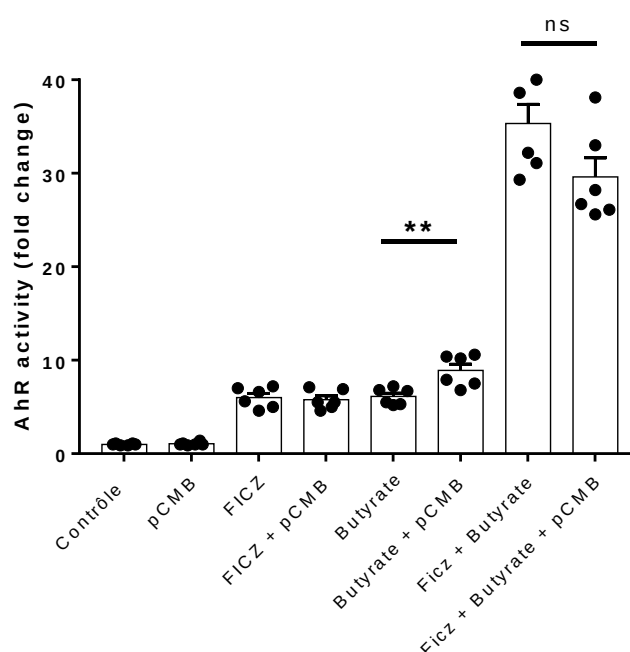


Figure 13 Impact de l'inhibition de MCT1 par le pCM sur l'activation de AhR médiée par le butyrate seul ou en combinaison avec FICZ. Les cellules HepG2^{luc} (20 000 cellules/puit) ont été traitées en triplicat pendant 24H avec du FICZ (10ng/ml), du butyrate (1mM) ou la combinaison du FICZ avec le butyrate en absence ou en présence de pCMB (Sigma Aldrich, Cat.N°.8203080005 ; 10μM) dans un milieu sans SBF. L'activité AhR a été mesurée par luminescence dans le surnageant cellulaire et les résultats ont été normalisés avec la valeur de la LDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM de deux expériences indépendantes.

L'inhibition du transporteur MCT1 augmentait l'activation de AhR par le butyrate seul mais n'avait pas d'impact sur l'activation de AhR par FICZ seul ou en combinaison avec le butyrate (**Figure 13**) ce qui suggère que MCT-1 n'est pas impliqué dans le processus synergique. Ces résultats rejoignent ceux de Marinelli et al qui avaient aussi montré une non-implication de MCT1 dans l'activation de AhR par le butyrate ([Marinelli et al., 2019](#)).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le butyrate entre dans la cellule en utilisant les transporteurs MCT1 et SMCT1 mais que la diffusion passive du butyrate à travers la membrane serait majoritairement responsable de son action d'inhibiteur d'HDAC dans notre étude.

- Sur quelles HDACs agissent le butyrate et le propionate ?

Le propionate et le butyrate fonctionnent comme des iHDACs mais, contrairement à la TSA, le propionate et le butyrate inhiberaient spécifiquement HDAC1 et HDAC3 ([Thangaraju et al., 2008](#)). HDAC1 et HDAC3 appartiennent aux HDACs de classe I dépendantes du zinc (qui comprend aussi HDAC2 et HDAC8) et sont principalement localisées dans le noyau contrairement aux HDAC de classe II (telles que les HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10) qui sont localisées à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme ([Sarkar et al., 2020](#)).

Il a été montré que HDAC1 était associée au promoteur du *Cyp1a1* murin permettant de maintenir l'expression du gène muette en absence d'activation de AhR ([Schnekenburger et al., 2007](#)). L'inhibition de HDAC1 par le butyrate diminuait considérablement la liaison

de HDAC1 au niveau du domaine amplificateur et du promoteur proximal mais ne favorisait pas la liaison de AhR sur chacun de ces domaines en absence de ligand. Compte tenu de la présence probable de ligands AhR dans le milieu de culture cellulaire (Oberg et al., 2005), nous avons évalué si l'inhibition sélective de HDAC1 permettait de récapituler les effets du butyrate sur la synergie d'activation de AhR. Nous avons utilisé pour cela du MS-275 (appelé aussi Entinostat), un inhibiteur préférentiel de HDAC1 par rapport à HDAC3 et qui ne possède aucune activité sur HDAC8 (Sarkar et al., 2020). La présence de MS-275 ne modifiait pas l'activation de AhR médiée par le butyrate seul et ne mimait pas l'effet du butyrate sur l'activation de AhR médiée par FICZ (**Figure 14**).

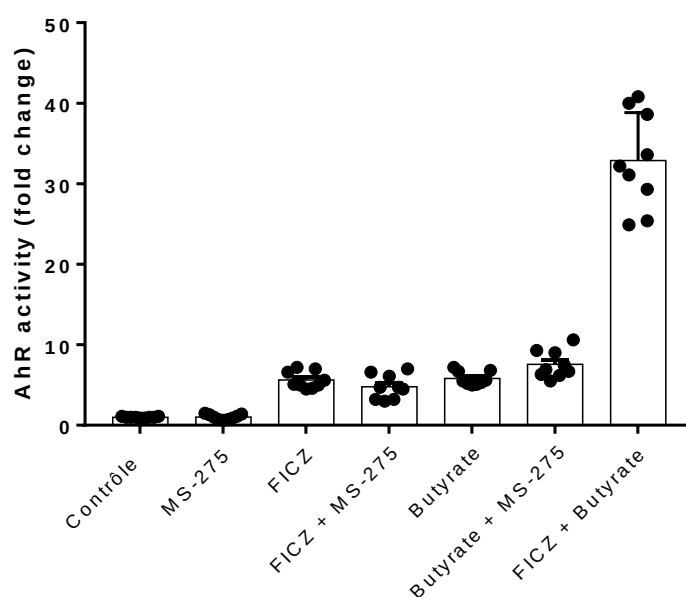


Figure 14 Impact de l'inhibition de HDAC1 par le MS-275 sur l'activation de AhR médiée par le butyrate ou par FICZ. Les cellules HepG2^{Luc} (20 000 cellules/puit) ont été traitées en triplicat pendant 24H avec du FICZ (10ng/ml), du butyrate (1mM) ou la combinaison du FICZ avec le butyrate en absence ou en présence de MS-275 (Sigma Aldrich, Cat.N°.EPS002 ; 250nM) dans un milieu sans SBF. L'activité AhR a été mesurée par luminescence dans le surnageant cellulaire et les résultats ont été normalisés avec la valeur de la LDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM de trois expériences indépendantes.

Nos résultats montrent que HDAC1 n'est pas impliquée dans l'activation de AhR. Ces résultats concordent avec ceux précédemment publié montrant que l'inhibition de

HDAC1 était une condition nécessaire mais pas suffisante à l'induction de l'expression du *Cyp1a1* (Schnekenburger et al., 2007).

HDAC3 joue un rôle crucial dans la régulation de la transcription des gènes en modulant STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Sarkar et al., 2020). HDAC3 a été reliée à la physiopathologie de l'inflammation intestinale puisque son expression est réduite dans les CEIs des patients atteints de MICI par rapport aux sujets sains (Alenghat et al., 2013) et les souris dépourvues de HDAC3 dans les CEIs développaient une inflammation spontanée (Alenghat et al., 2013). Un inhibiteur sélectif d'HDAC3 bien connu est RGFP966 (IC₅₀ = 0,08 µM) qui a été utilisé comme outil moléculaire pour étudier le rôle de HDAC3 (Sarkar et al., 2020). Afin de déterminer si l'effet synergique observé reposait sur une inhibition spécifique de HDAC3 par le butyrate, nous avons testé l'impact du composé RGFP966 sur les cellules rapportrices HepG2^{luc}. La présence de RGFP966 augmentait de façon significative l'activation de AhR lorsque la stimulation des cellules s'effectuait avec FICZ ou le butyrate seuls sans toutefois atteindre le niveau d'activation de la combinaison du butyrate avec FICZ (**Figure 15**).

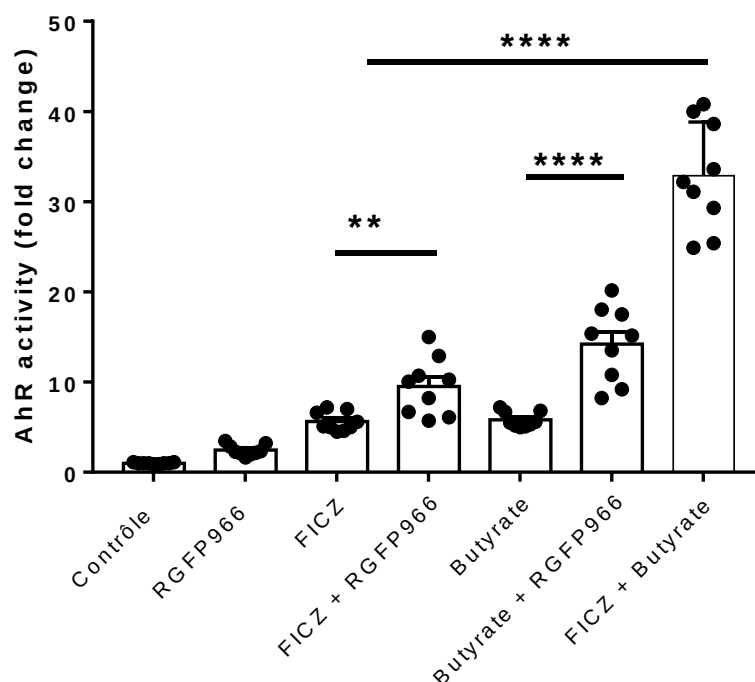


Figure 15 Impact de l'inhibition de HDAC3 par le RGFP966 sur l'activation de AhR médiée par le butyrate ou par FICZ. Les cellules HepG2^{luc} (20 000 cellules/puit) ont été traitées en triplicat pendant 24H avec du FICZ (10ng/ml), du butyrate (1mM) ou la combinaison du FICZ avec le butyrate en absence ou en présence de RGFP966 (Sigma Aldrich, Cat.N°. SML1652 ; 1µM) dans un milieu sans SBF. L'activité AhR a été mesurée par luminescence dans le surnageant cellulaire et les résultats ont été normalisés avec la valeur de la LDH. Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM de deux expériences indépendantes.

Puisque des résultats précédemment publiés ont montré que l'inhibition de HDAC1 était une condition nécessaire mais pas suffisante à l'induction de l'expression du *Cyp1a1* (Schnekenburger et al., 2007), il serait intéressant de tester l'inhibition simultanée de HDAC1 et HDAC3 sur l'activation de AhR.

De nombreux inhibiteurs de HDACs sont déjà sur le marché tels que le vorinostat, principalement utilisés en cancérologie. La difficulté reste de déterminer l'implication de chaque HDAC dans le processus pathologique afin de développer des iHDAC sélectifs (Sarkar et al., 2020). Il a récemment été montré que le microbiote influençait l'activation de HDAC3 via le métabolisme des phytates et la production d'inositol-1,4,5-

trisphosphate favorisant la récupération des animaux après une colite induite au DSS ainsi que la réparation épithéliale (Wu et al., 2020). Contrairement aux pathologies cancéreuses où l'activation de HDAC3 est une stratégie d'échappement tumoral, les pathologies inflammatoires telles que la MC pourraient tirer bénéfice d'une activation de certaines HDACs. Toute la difficulté reste à déterminer précisément le type d'HDAC en cause pour une pathologie donnée mais également la dynamique épigénétique mise en place dans un écosystème intestinal sain.

2. Perspectives à plus long terme

Mon travail de thèse s'articule autour de plusieurs perspectives thérapeutiques qui ont déjà été expérimentées dans la littérature de manière isolée et sont détaillées ci-dessous.

Supplémentation en L-trp des patients

Dans un modèle de maladie cœliaque, Lamas et al ont administré deux types de régime aux souris. Celles avec une diète riche en L-trp conduisait à une hausse des métabolites issus du microbiote comme la tryptamine, l'IAld et l'indole lactate ainsi qu'une hausse des bactéries productrices de ces dérivés indoles comme le genre *Lactobacillus*. A l'inverse, les souris avec une diète pauvre en L-trp présentait une hausse des métabolites issus de la voie IDO1 comme la L-kyn. L'hypothèse repose ici sur le fait que la supplémentation en L-trp modifierait le microbiote pour l'établissement d'espèces capables de le métaboliser en dérivés indoles (Lamas et al., 2020). Cet effet bénéfique se traduisait par une diminution de la lipocaline-2 fécale, de l'expression duodénale de l'IL6 ainsi que d'une diminution de la perméabilité intestinale. Après ingestion de gluten,

la différence entre les souris ayant reçu une diète pauvre ou riche en L-trp se distinguait au niveau de la composition de leur microbiote avec un microbiote capable de produire des ligands de AhR lorsque la diète était riche en L-trp. Cette supplémentation ne permettant toutefois pas d'abolir le shift microbien suite à une dose de gluten mais d'au moins garder la capacité fonctionnelle du microbiote dans la production de ligands AhR, dans la réduction de la lipocaline-2 fécale et dans l'expression duodénale de l'IL6. Cet effet était renforcé lorsque la supplémentation en L-trp s'accompagnait d'une supplémentation en *L. reuteri*, souche capable de métaboliser le L-trp en ligands de AhR. La supplémentation en L-trp est une piste intéressante mais le devenir du L-trp dans l'organisme reste soumis à l'activité de diverses enzymes. Outre sa métabolisation en dérivés indoles bénéfiques, le L-trp suit majoritairement une métabolisation par deux enzymes limitantes de la voie des kynurénines appelées TDO et IDO1 ([Yeung et al., 2015](#)). Contrairement à TDO, IDO1 est induite par différentes cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN- γ et joue un rôle prépondérant dans les contextes inflammatoires ([Badawy, 2017](#)). La voie des kynurénines aboutissant à des dérivés potentiellement délétères comme QUIN, une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs des voies du L-trp semble nécessaire avant d'envisager une supplémentation hasardeuse chez les patients.

Supplémentation en probiotiques

Les probiotiques sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé comme des microorganismes qui, administrés vivants et en quantité adéquate à l'hôte, apportent des effets bénéfiques sur la santé ([Hill et al., 2014](#)). La majorité des probiotiques vendus dérivent d'une liste assez limitée qui inclut les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et la levure *Saccharomyces*. Certains d'entre eux ont montré une amélioration marginale dans

certaines états pathologiques et une absence d'effet ciblé sur une pathologie spécifique. Plus récemment avec l'amélioration rapide des connaissances sur le microbiote intestinal, un effort important d'identification et de caractérisation de nouvelles souches isolées de l'intestin a été mené afin de cibler de manière spécifique des mécanismes d'action et des pathologies (Chang et al., 2019). Ces probiotiques de nouvelle génération, appelés produits vivants de biothérapie, correspondent à des microorganismes vivants (bactéries, levures) avec un effet thérapeutique ou préventif attendu dépendant de leur voie d'administration. Ils peuvent contenir des microorganismes isolés à partir d'échantillons humains et/ou des microorganismes recombinant surexprimant des gènes d'intérêt (Ross et al., 2008). La stratégie reviendrait à administrer des souches bactériennes telles que *Lactobacillus* capables de produire *in situ* des métabolites d'intérêt telles que des ligands de AhR (Zelante et al., 2013). *In vivo*, l'administration de trois souches de *Lactobacillus* capables de métaboliser le tryptophane s'est d'ailleurs montrée efficace pour atténuer l'inflammation intestinale via l'activation de la AHR, les effets étant abrogés en présence d'un antagoniste de AHR (Lamas et al., 2016). Pour aller plus loin, et parce que les souches produisant des ligands de AhR sont distinctes de celles produisant des AGCCs, il serait envisageable de combiner ces différentes souches dans une même thérapeutique. *Faecalibacterium prausnitzii* est l'une des bactéries anaérobies les plus abondantes dans l'intestin humain normal dont la concentration dans les selles de patients atteints de MICI est significativement réduite (Sokol et al., 2009). *In vivo*, cette bactérie permettait de réduire l'inflammation et de corriger la dysbiose dans un modèle de colite murine. *F. prausnitzii* produit environ 10mM de butyrate lors de sa croissance en anaérobie, un AGCC qui possède, en plus d'activer le récepteur AhR, possède également la capacité de diminuer l'expression de IDO1 (Marinelli et al., 2019; Martin-Gallausiaux et al., 2018).

Supplémentation en post-biotiques

Les post-biotiques ont récemment été proposés comme des produits bactériens "non viables" ou des métabolites produits par des micro-organismes probiotiques pour favoriser l'activité biologique de l'hôte. Une évaluation comparative du microbiote intestinal d'individus sains et de patients atteints de MICI a montré que les profils métaboliques et donc la fonction microbienne, étaient plus perturbés que la composition du microbiote lui-même ([Morgan et al., 2012](#)). De plus, notre travail s'est basé sur des expériences menées sur des souris axéniques suggérant que l'abondance d'environ 70 % des métabolites intestinaux étaient influencés par le microbiote intestinal ([Matsumoto et al., 2012](#)). Plusieurs molécules seraient de bons candidats. Par exemple, l'IPA est un dérivé de l'indole conjugué au propionate et l'IPA est sélectivement diminuée dans le sérum circulant de sujets humains atteints de colite active par rapport aux individus en bonne santé ([Alexeev et al., 2018](#)). Le propionate est quant à lui un AGCC qui s'épuise dans les MICI actives ([Machiels et al., 2014](#)). Cette diminution d'IPA pourrait s'expliquer par la dysbiose associée aux MICI et résulterait d'un appauvrissement à la fois du microbiote producteur d'AGCCs et de métabolites du L-trp. L'administration orale d'IPA s'est montrée protectrice dans un modèle murin de colite puisque les animaux ayant reçu la molécule présentaient moins de signes physiques de la maladie et moins de lésions intestinales ([Alexeev et al., 2018](#)). Toute la difficulté de l'utilisation de postbiotiques réside dans le fait de cibler précisément le tissu d'intérêt. Une équipe a cependant réussi à encapsuler de façon gastro-résistante l'IAld, une molécule dérivée du L-trp activant AhR et produite par le genre *Lactobacillus* ([Zelante et al., 2013](#)), afin de permettre sa libération au niveau de l'intestin ([Puccetti et al., 2018](#)). Mais le bénéfice des dérivés indoles ne

s'arrête pas aux molécules dérivées du microbiote. Ainsi, un essai randomisé et contrôlé de 8 semaines versus placebo utilisant *Indigo naturalis*, une médecine traditionnelle chinoise contenant des ligands AhR, a également montré des avantages chez les patients atteints de colite ([Naganuma et al., 2018](#)).

En conclusion, nous montrons que le butyrate agit en synergie avec les ligands AhR dérivés du microbiote endogène pour augmenter l'activité AhR dans les cellules des mammifères. L'analyse systématique de tous les mécanismes potentiels impliqués a révélé que le butyrate n'était pas un ligand AhR mais qu'il potentialisait l'activation d'AhR en augmentant le recrutement d'AhR vers le promoteur du gène cible par un mécanisme dépendant de l'inhibition d'HDAC, et plus particulièrement de HDAC3. Ces résultats soutiennent l'existence d'interactions complexes entre de multiples métabolites dérivés de l'intestin qui méritent une exploration approfondie. En outre, ils ouvrent la voie à de nouvelles thérapies pour moduler les activités AhR dans l'intestin, en utilisant des produits biothérapeutiques vivants produisant du butyrate et des indoles, ou en utilisant directement des mélanges de métabolites ou via des ligands AhR puissants produits par mimétisme de métabolites microbiens ([Dvořák et al., 2020](#)).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agus, A., Planchais, J., and Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* 23, 716–724.
- Agus, A., Clément, K., and Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut* 70, 1174–1182.
- Alexeev, E.E., Lanis, J.M., Kao, D.J., Campbell, E.L., Kelly, C.J., Battista, K.D., Gerich, M.E., Jenkins, B.R., Walk, S.T., Kominsky, D.J., et al. (2018). Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *The American Journal of Pathology* 188, 1183–1194.
- Badawy, A.A.-B. (2017). Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int J Tryptophan Res* 10, 1178646917691938.
- Bessede, A., Gargaro, M., Pallotta, M.T., Matino, D., Servillo, G., Brunacci, C., Biciato, S., Mazza, E.M., Macchiarulo, A., Vacca, C., et al. (2014). Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defense pathway. *Nature* 511, 184–190.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 54, 2325–2340.
- Bohonowych, J.E., and Denison, M.S. (2007). Persistent Binding of Ligands to the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicol Sci* 98, 99–109.
- Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology* 14, 660–667.
- Chang, C.-J., Lin, T.-L., Tsai, Y.-L., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., and Lai, H.-C. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *J Food Drug Anal* 27, 615–622.
- Chen, J., Zhao, K.-N., and Vitetta, L. (2019). Effects of Intestinal Microbial–Elaborated Butyrate on Oncogenic Signaling Pathways. *Nutrients* 11, 1026.
- Chng, S.H., Kundu, P., Dominguez-Brauer, C., Teo, W.L., Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y., Mak, T.W., and Pettersson, S. (2016). Ablating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in CD11c+ cells perturbs intestinal epithelium development and intestinal immunity. *Scientific Reports* 6, 23820.
- Ciolino, H.P., MacDonald, C.J., Memon, O.S., Bass, S.E., and Yeh, G.C. (2006). Sulindac regulates the aryl hydrocarbon receptor-mediated expression of Phase 1 metabolic enzymes in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* 27, 1586–1592.
- Cresci, G.A., Thangaraju, M., Mellinger, J.D., Liu, K., and Ganapathy, V. (2010). Colonic gene expression in conventional and germ-free mice with a focus on the butyrate receptor GPR109A and the butyrate transporter SLC5A8. *J. Gastrointest. Surg.* 14, 449–461.
- Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43, 309–334.

- DiNatale, B.C., Murray, I.A., Schroeder, J.C., Flaveny, C.A., Lahoti, T.S., Laurenzana, E.M., Omiecinski, C.J., and Perdew, G.H. (2010). Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicol Sci* 115, 89–97.
- Dong, F., Hao, F., Murray, I.A., Smith, P.B., Koo, I., Tindall, A.M., Kris-Etherton, P.M., Gowda, K., Amin, S.G., Patterson, A.D., et al. (2020). Intestinal microbiota-derived tryptophan metabolites are predictive of Ah receptor activity. *Gut Microbes* 12, 1788899.
- Donohoe, D.R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T.M., Bunger, M.K., and Bultman, S.J. (2011). The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism* 13, 517–526.
- Donohoe, D.R., Collins, L.B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., and Bultman, S.J. (2012). The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Molecular Cell* 48, 612–626.
- Dudakov, J.A., Hanash, A.M., and van den Brink, M.R.M. (2015). Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol* 33, 747–785.
- Esser, C., and Rannug, A. (2015). The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology. *Pharmacol Rev* 67, 259–279.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., et al. (2006). The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor ζ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *The Journal of Immunology* 176, 6752–6761.
- Fellows, R., and Varga-Weisz, P. (2019). Chromatin dynamics and histone modifications in intestinal microbiota-host crosstalk. *Mol Metab* 38.
- Fellows, R., Denizot, J., Stellato, C., Cuomo, A., Jain, P., Stoyanova, E., Balázsi, S., Hajnády, Z., Liebert, A., Kazakevych, J., et al. (2018). Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nat Commun* 9, 105.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450.
- Gao, J., Xu, K., Liu, H., Liu, G., Bai, M., Peng, C., Li, T., and Yin, Y. (2018). Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* 8.
- Gargaro, M., Scalisi, G., Manni, G., Mondanelli, G., Grohmann, U., and Fallarino, F. (2021). The Landscape of AhR Regulators and Coregulators to Fine-Tune AhR Functions. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 757.
- Gasaly, N., Hermoso, M.A., and Gotteland, M. (2021). Butyrate and the Fine-Tuning of Colonic Homeostasis: Implication for Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci* 22.
- Guengerich, F.P. (2015). Human Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, P.R. Ortiz de Montellano, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 523–785.

- Gutiérrez-Vázquez, C., and Quintana, F.J. (2018). Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity* 48, 19–33.
- Hahn, M.E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution¹¹Invited review for Chemico-Biological Interactions. *Chemico-Biological Interactions* 141, 131–160.
- He, J., Zhang, P., Shen, L., Niu, L., Tan, Y., Chen, L., Zhao, Y., Bai, L., Hao, X., Li, X., et al. (2020). Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci* 21.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506–514.
- Hubbard, T.D., Murray, I.A., Bisson, W.H., Lahoti, T.S., Gowda, K., Amin, S.G., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Sci Rep* 5.
- Husted, A.S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S.A., and Schwartz, T.W. (2017). GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metabolism* 25, 777–796.
- Jin, U.-H., Lee, S.-O., Sridharan, G., Lee, K., Davidson, L.A., Jayaraman, A., Chapkin, R.S., Alaniz, R., and Safe, S. (2014). Microbiome-Derived Tryptophan Metabolites and Their Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Agonist and Antagonist Activities. *Mol Pharmacol* 85, 777–788.
- Jin, U.-H., Cheng, Y., Park, H., Davidson, L.A., Callaway, E.S., Chapkin, R.S., Jayaraman, A., Asante, A., Allred, C., Weaver, E.A., et al. (2017). Short Chain Fatty Acids Enhance Aryl Hydrocarbon (Ah) Responsiveness in Mouse Colonocytes and Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *Scientific Reports* 7, 10163.
- Jing, W., Dong, S., Luo, X., Liu, J., Wei, B., Du, W., Yang, L., Luo, H., Wang, Y., Wang, S., et al. (2021). Berberine improves colitis by triggering AhR activation by microbial tryptophan catabolites. *Pharmacological Research* 164, 105358.
- Kewley, R.J., Whitelaw, M.L., and Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 189–204.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165, 1332–1345.
- Krautkramer, K.A., Fan, J., and Bäckhed, F. (2020). Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature Reviews Microbiology* 1–18.
- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* 22, 598–605.
- Lamas, B., Natividad, J.M., and Sokol, H. (2018). Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol* 11, 1024–1038.

- Lamas, B., Hernandez-Galan, L., Galipeau, H.J., Constante, M., Clarizio, A., Jury, J., Breyner, N.M., Caminero, A., Rueda, G., Hayes, C.L., et al. (2020). Aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is decreased in celiac disease leading to intestinal inflammation. *Science Translational Medicine* 12.
- Lavelle, A., and Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 17, 223–237.
- Lefèvre, A., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Attucci, S., Dufour, D., Sokol, H., and Emond, P. (2019). Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta* 195, 593–598.
- Li, K., Hao, Z., Du, J., Gao, Y., Yang, S., and Zhou, Y. (2021). *Bacteroides thetaiotaomicron* relieves colon inflammation by activating aryl hydrocarbon receptor and modulating CD4+T cell homeostasis. *International Immunopharmacology* 90, 107183.
- Li, Y., Innocentin, S., Withers, D.R., Roberts, N.A., Gallagher, A.R., Grigorieva, E.F., Wilhelm, C., and Veldhoen, M. (2011). Exogenous Stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Cell* 147, 629–640.
- Liu, H., Wang, J., He, T., Becker, S., Zhang, G., Li, D., and Ma, X. (2018). Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Advances in Nutrition* 9, 21–29.
- Liu, J.-L., Segovia, I., Yuan, X.-L., and Gao, Z. (2020). Controversial Roles of Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) on Pancreatic β -Cell Growth and Insulin Secretion. *Int J Mol Sci* 21.
- Louis, P., Duncan, S.H., McCrae, S.I., Millar, J., Jackson, M.S., and Flint, H.J. (2004). Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *J Bacteriol* 186, 2099–2106.
- Ma, Q., and Baldwin, K.T. (2000). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway ROLE OF THE TRANSCRIPTION ACTIVATION AND DNA BINDING OF AhR. *J. Biol. Chem.* 275, 8432–8438.
- Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., Preter, V.D., Arijis, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Immerseel, F.V., Verbeke, K., et al. (2014). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275–1283.
- Manasanch, E.E., and Orlowski, R.Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 14, 417–433.
- Manzella, C., Singhal, M., Alrefai, W.A., Saksena, S., Dudeja, P.K., and Gill, R.K. (2018). Serotonin is an endogenous regulator of intestinal CYP1A1 via AhR. *Sci Rep* 8.
- Manzella, C.R., Ackerman, M., Singhal, M., Ticho, A.L., Ceh, J., Alrefai, W.A., Saksena, S., Dudeja, P.K., and Gill, R.K. (2020). Serotonin modulates AhR activation by interfering with CYP1A1-mediated clearance of AhR ligands. *Cell. Physiol. Biochem.* 54, 126–141.
- Marinelli, L., Martin-Gallausiaux, C., Bourhis, J.-M., Béguet-Crespel, F., Blottière, H.M., and Lapaque, N. (2019). Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 9, 643.

Martin, C.R., Osadchiy, V., Kalani, A., and Mayer, E.A. (2018). The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 6, 133–148.

Martin-Gallausiaux, C., Larraufie, P., Jarry, A., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Ledue, F., Reimann, F., Blottière, H.M., and Lapaque, N. (2018). Butyrate Produced by Commensal Bacteria Down-Regulates Indolamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO-1) Expression via a Dual Mechanism in Human Intestinal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* 9.

Mishra, S.P., Karunakar, P., Taraphder, S., and Yadav, H. (2020). Free Fatty Acid Receptors 2 and 3 as Microbial Metabolite Sensors to Shape Host Health: Pharmacophysiological View. *Biomedicines* 8, 154.

Modoux, M., Rolhion, N., Mani, S., and Sokol, H. (2021). Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target. *Trends in Pharmacological Sciences* 42, 60–73.

Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T.T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2011). Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* 141, 237–248.e1.

Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., Reyes, J.A., Shah, S.A., LeLeiko, N., Snapper, S.B., et al. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 13, R79.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science* 317, 256–260.

Murray, I.A., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer* 14, 801–814.

Naganuma, M., Sugimoto, S., Mitsuyama, K., Kobayashi, T., Yoshimura, N., Ohi, H., Tanaka, S., Andoh, A., Ohmiya, N., Saigusa, K., et al. (2018). Efficacy of Indigo Naturalis in a Multicenter Randomized Controlled Trial of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 154, 935–947.

Nakajima, M., Iwanari, M., and Yokoi, T. (2003). Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells. *Toxicology Letters* 144, 247–256.

Nematollahi, A., Sun, G., Jayawickrama, G.S., and Church, W.B. (2016). Kynurenine Aminotransferase Isozyme Inhibitors: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 946.

N’Guyen, Q.-B., Fallone, F., Seree, E., Fina, F., Villard, P.-H., Guigal, N., De Meo, M., Lacarelle, B., Martin, P.-M., and Barra, Y. (2002). Serum increases CYP1A1 induction by 3-methylcholanthrene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297, 249–254.

Nikolaus, S., Schulte, B., Al-Massad, N., Thieme, F., Schulte, D.M., Bethge, J., Rehman, A., Tran, F., Aden, K., Häsler, R., et al. (2017). Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 153, 1504–1516.e2.

Oberg, M., Bergander, L., Håkansson, H., Rannug, U., and Rannug, A. (2005). Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol Sci* 85, 935–943.

Parada Venegas, D., De la Fuente, M.K., Landskron, G., González, M.J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H.J.M., Faber, K.N., and Hermoso, M.A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 10, 277.

Piper, C.J.M., Rosser, E.C., Oleinika, K., Nistala, K., Krausgruber, T., Rendeiro, A.F., Banos, A., Drozdov, I., Villa, M., Thomson, S., et al. (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor Contributes to the Transcriptional Program of IL-10-Producing Regulatory B Cells. *Cell Rep* 29, 1878-1892.e7.

Pollenz, R.S. (2002). The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chemico-Biological Interactions* 141, 41–61.

Poul, E.L., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.-Y., Lannoy, V., Decobecq, M.-E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Damme, J.V., et al. (2003). Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *J. Biol. Chem.* 278, 25481–25489.

Puccetti, M., Giovagnoli, S., Zelante, T., Romani, L., and Ricci, M. (2018). Development of Novel Indole-3-Aldehyde-Loaded Gastro-Resistant Spray-Dried Microparticles for Postbiotic Small Intestine Local Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107, 2341–2353.

Puga, A., Ma, C., and Marlowe, J.L. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology* 77, 713–722.

Qiu, J., Heller, J.J., Guo, X., Chen, Z.E., Fish, K., Fu, Y.-X., and Zhou, L. (2012). The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 36, 92–104.

Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71.

Quintana, F.J., Murugaiyan, G., Farez, M.F., Mitsdoerffer, M., Tukpah, A.-M., Burns, E.J., and Weiner, H.L. (2010). An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20768–20773.

Rannug, U., Rannug, A., Sjöberg, U., Li, H., Westerholm, R., and Bergman, J. (1995). Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem. Biol.* 2, 841–845.

Reigstad, C.S., Salmonson, C.E., Rainey, J.F., Szurszewski, J.H., Linden, D.R., Sonnenburg, J.L., Farrugia, G., and Kashyap, P.C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J* 29, 1395–1403.

Romani, L., Zelante, T., Luca, A.D., Iannitti, R.G., Moretti, S., Bartoli, A., Aversa, F., and Puccetti, P. (2014). Microbiota control of a tryptophan-AhR pathway in disease tolerance to fungi. *European Journal of Immunology* 44, 3192–3200.

Ross, J.J., Boucher, P.E., Bhattacharyya, S.P., Kopecko, D.J., Sutkowski, E.M., Rohan, P.J., Chandler, D.K.F., and Vaillancourt, J. (2008). Considerations in the development of live biotherapeutic products for clinical use. *Curr Issues Mol Biol* 10, 13–16.

- Rosser, E.C., Piper, C.J.M., Matei, D.E., Blair, P.A., Rendeiro, A.F., Orford, M., Alber, D.G., Krausgruber, T., Catalan, D., Klein, N., et al. (2020). Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells. *Cell Metab.* 31, 837-851.e10.
- Rothhammer, V., and Quintana, F.J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol* 19, 184–197.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., and Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* 57, 1–24.
- Sarkar, R., Banerjee, S., Amin, S.A., Adhikari, N., and Jha, T. (2020). Histone deacetylase 3 (HDAC3) inhibitors as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 192, 112171.
- Schiering, C., Wincent, E., Metidji, A., Iseppon, A., Li, Y., Potocnik, A.J., Omenetti, S., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Nebert, D.W., et al. (2017). Feedback Control of AHR Signaling Regulates Intestinal Immunity. *Nature* 542, 242–245.
- Schilderink, R., Verseijden, C., and de Jonge, W.J. (2013). Dietary Inhibitors of Histone Deacetylases in Intestinal Immunity and Homeostasis. *Front Immunol* 4.
- Schnekenburger, M., Peng, L., and Puga, A. (2007). HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated trans-activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 569–578.
- Schroeder, J.C., DiNatale, B.C., Murray, I.A., Flaveny, C.A., Liu, Q., Laurenzana, E.M., Lin, J.M., Strom, S.C., Omiecinski, C.J., Amin, S., et al. (2010). The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry* 49, 393–400.
- Seok, S.-H., Ma, Z.-X., Feltenberger, J.B., Chen, H., Chen, H., Scarlett, C., Lin, Z., Satyshur, K.A., Cortopassi, M., Jefcoate, C.R., et al. (2018). Trace derivatives of kynurenine potently activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *J. Biol. Chem.* 293, 1994–2005.
- Shinde, R., and McGaha, T.L. (2018). The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. *Trends Immunol* 39, 1005–1020.
- Shinde, R., Hezaveh, K., Halaby, M.J., Kloetgen, A., Chakravarthy, A., da Silva Medina, T., Deol, R., Manion, K.P., Baglaenko, Y., Eldh, M., et al. (2018). Apoptotic cell-induced AhR activity is required for immunological tolerance and suppression of systemic lupus erythematosus in mice and humans. *Nature Immunology* 19, 571–582.
- Singh, N., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Martin, P.M., Lambert, N.A., Boettger, T., Offermanns, S., and Ganapathy, V. (2010). Blockade of Dendritic Cell Development by Bacterial Fermentation Products Butyrate and Propionate through a Transporter (Slc5a8)-dependent Inhibition of Histone Deacetylases. *J Biol Chem* 285, 27601–27608.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., Cosnes, J., Corthier, G., Marteau, P., and Doré, J. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15, 1183–1189.

Stepankova, M., Bartonkova, I., Jiskrova, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., and Dvorak, Z. (2018). Methylinindoles and methoxyindoles are agonists and antagonists of human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Mol. Pharmacol.*

Stilling, R.M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International* 99, 110–132.

Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., and Duarte, J.H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 403–432.

Stockinger, B., Shah, K., and Wincent, E. (2021). AHR in the intestinal microenvironment: safeguarding barrier function. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 1–12.

Takamura, T., Harama, D., Matsuoka, S., Shimokawa, N., Nakamura, Y., Okumura, K., Ogawa, H., Kitamura, M., and Nakao, A. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Immunology & Cell Biology* 88, 685–689.

Takamura, T., Harama, D., Fukumoto, S., Nakamura, Y., Shimokawa, N., Ishimaru, K., Ikegami, S., Makino, S., Kitamura, M., and Nakao, A. (2011). *Lactobacillus bulgaricus* OLL1181 activates the aryl hydrocarbon receptor pathway and inhibits colitis. *Immunology & Cell Biology* 89, 817–822.

Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., and Macia, L. (2014). Chapter Three - The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 91–119.

Thaiss, C.A., Zmora, N., Levy, M., and Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65–74.

Thangaraju, M., Gopal, E., Martin, P.M., Ananth, S., Smith, S.B., Prasad, P.D., Sterneck, E., and Ganapathy, V. (2006). SLC5A8 Triggers Tumor Cell Apoptosis through Pyruvate-Dependent Inhibition of Histone Deacetylases. *Cancer Res* 66, 11560–11564.

Thangaraju, M., Carswell, K.N., Prasad, P.D., and Ganapathy, V. (2008). Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochemical Journal* 417, 379–389.

Thangaraju, M., Cresci, G.A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J.P., Browning, D.D., Mellinger, J.D., Smith, S.B., Digby, G.J., Lambert, N.A., et al. (2009). GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res.* 69, 2826–2832.

Thursby, E., and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 474, 1823–1836.

Venkatesh, M., Mukherjee, S., Wang, H., Li, H., Sun, K., Benechet, A.P., Qiu, Z., Maher, L., Redinbo, M.R., Phillips, R.S., et al. (2014). Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-like Receptor 4. *Immunity* 41, 296–310.

Vogel, C.F.A., and Haarmann-Stemmann, T. (2017). The aryl hydrocarbon receptor repressor – More than a simple feedback inhibitor of AhR signaling: Clues for its role in inflammation and cancer. *Current Opinion in Toxicology* 2, 109–119.

Vyhlídalová, B., Krasulová, K., Pečinková, P., Marcalíková, A., Vrzal, R., Zemánková, L., Vančo, J., Trávníček, Z., Vondráček, J., Karasová, M., et al. (2020). Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci* 21.

Wang, G., Huang, S., Wang, Y., Cai, S., Yu, H., Liu, H., Zeng, X., Zhang, G., and Qiao, S. (2019). Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3917–3937.

Wang, Z., Snyder, M., Kenison, J.E., Yang, K., Lara, B., Lydell, E., Bennani, K., Novikov, O., Federico, A., Monti, S., et al. (2021). How the AHR Became Important in Cancer: The Role of Chronically Active AHR in Cancer Aggression. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 387.

Whitfield-Cargile, C.M., Cohen, N.D., Chapkin, R.S., Weeks, B.R., Davidson, L.A., Goldsby, J.S., Hunt, C.L., Steinmeyer, S.H., Menon, R., Suchodolski, J.S., et al. (2016). The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes* 7, 246–261.

Wincent, E., Bengtsson, J., Bardbori, A.M., Alsberg, T., Luecke, S., Rannug, U., and Rannug, A. (2012). Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4479–4484.

Wong, J.M.W., de Souza, R., Kendall, C.W.C., Emam, A., and Jenkins, D.J.A. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 40, 235–243.

Wu, S., Hashimoto-Hill, S., Woo, V., Eshleman, E.M., Whitt, J., Engleman, L., Karns, R., Denson, L.A., Haslam, D.B., and Alenghat, T. (2020). Microbiota-derived metabolite promotes HDAC3 activity in the gut. *Nature* 586, 108–112.

Xu, C., Li, C.Y.-T., and Kong, A.-N.T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28, 249–268.

Yang, W., Yu, T., Huang, X., Bilotta, A.J., Xu, L., Lu, Y., Sun, J., Pan, F., Zhou, J., Zhang, W., et al. (2020). Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nature Communications* 11, 4457.

Yano, J.M., Yu, K., Donaldson, G.P., Shastri, G.G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C.R., Ismagilov, R.F., Mazmanian, S.K., and Hsiao, E.Y. (2015). Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* 161, 264–276.

Yeung, A.W.S., Terentis, A.C., King, N.J.C., and Thomas, S.R. (2015). Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clinical Science* 129, 601–672.

Zelante, T., Iannitti, R.G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., et al. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385.

Zou, J., Chassaing, B., Singh, V., Pellizzon, M., Ricci, M., Fythe, M., Kumar, M.V., and Gewirtz, A.T. (2018). Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. *Cell Host Microbe* 23, 41-53.e4.

ANNEXES

ANNEXE 1: Butyrate acts through HDAC inhibition to enhance aryl hydrocarbon receptor activation by gut microbiota-derived ligands

ANNEXE 2: Tryptophan metabolism as a pharmacological target

ANNEXE 3: Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome

Butyrate acts through HDAC inhibition to enhance aryl hydrocarbon receptor activation by gut microbiota-derived ligands.

Author(s): Morgane Modoux^{1,2}, Nathalie Rolhion^{1,2}, Jeremie H. Lefevre^{2,3}, Cyriane Oeuvray^{1,2}, Petr Nádvorník⁴, Peter Illes⁴, Patrick Emond⁵, Yann Parc³, Sridhar Mani⁶, Zdenek Dvorak⁴, Harry Sokol^{1,2,7,*}

¹ Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Gastroenterology Department, F-75012 Paris, France

² Paris Centre for Microbiome Medicine (PaCeMM) FHU, Paris, France

³ Sorbonne Université, Department of Digestive Surgery, AP-HP, Hôpital Saint Antoine, F-75012, Paris, France

⁴ Departments of Cell Biology and Genetics, Palacký University, Olomouc 78371, Czech Republic.

⁵ UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, Centre-Val de Loire, France.

⁶ Departments of Molecular Pharmacology, Genetics and Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

⁷ INRAe, UMR1319 Micalis & AgroParisTech, Jouy en Josas, France

Soumis

INTRODUCTION

The gut microbiota is a complex ecosystem essential for host defense against infection, nutrient metabolism, and tissue repair. It synthesizes metabolites from dietary and host-derived molecules to modulate the host's enzymatic machinery (Atarashi et al., 2011; Martin-Gallausiaux et al., 2018; Reigstad et al., 2015; Sayin et al., 2013; Yano et al., 2015). These metabolites represent a central hub in the host-microbiota crosstalk and are dysregulated in several diseases, including inflammatory bowel diseases (IBD), metabolic syndrome and neuropsychiatric conditions (Agus et al., 2021; Lavelle and Sokol, 2020; Morais et al., 2021). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway is involved in several metabolic and immune processes, which are vital for intestinal homeostasis, as well as for optimal coexistence of the host and its microbiome (Korecka et al., 2016). First characterized as a receptor for environmental toxins, AhR is now recognized as a receptor for many microbial tryptophan (Trp) derivatives and is therefore emerging as an attractive pharmacological target for several conditions such as IBD, celiac disease, metabolic syndrome, liver disease, neurological disease and cancers (Agus et al., 2018; Lamas et al., 2016, 2020; Modoux et al., 2021; Natividad et al., 2018; Wrzosek et al., 2021).

After ligand binding, AhR translocates into the nucleus and dimerizes with AhR nuclear translocator (ARNT) before the dimer binds the target genes promoter sequence leading to their transcription. Target genes include cytochromes (CYP; *cyp1a* and *cyp1b*), interleukin *Il22*, and the AhR repressor (*ahrr*). Beyond microbial Trp metabolites, AhR binds many natural or synthetic ligands with a wide range of structural diversity (Denison and Nagy, 2003; Marinelli et al., 2019). About 70% of the observed variance in fecal

metabolites level is explained by the composition of the microbiota rather than host genetics (Zierer et al., 2018). Moreover, experiments in germ-free mice suggest that the abundance of 70% of the gut metabolites in colon content is impacted by the gut microbiota (Matsumoto et al., 2012). Nevertheless, no study has yet systematically investigated the impact of gut-derived microbial metabolites on AhR activity to date.

Here, following a systematic screen *in vitro*, we identified that the SCFA butyrate activates the AhR pathway. In further mechanistic experiments, we demonstrated that butyrate does not bind to AhR but synergizes with known ligands to enhance its activation. This synergistic effect between butyrate and Trp-derived AhR agonist was transposable *ex vivo* on human intestinal explants. We showed that butyrate acts by inhibiting histone deacetylases (HDAC), thus opening chromatin to increase the access of AhR-ligand complexes to their binding sites in the promoter of AhR target genes. Collectively, our data showed a crucial role of microbiota-derived SCFAs in modulating AhR activation induced by Trp-derived agonists.

RESULTS

Several gut microbiota dependent metabolites activate AhR *in vitro*.

To get an overall picture of the ability of microbiota-derived metabolites to activate AhR, we screened fifty-eight gut microbiota-dependent metabolites (some of which were identified by Matsumoto and colleagues (Matsumoto et al., 2012)) on AhR reporter human liver cell line (HepG2^{luc}). As expected, high AhR agonist activity was found for Trp-derived

metabolites, like indoxyl-3 sulfate and tryptamine (Figure 1A). Surprisingly, the highest AhR activation was found for the SCFAs butyrate and propionate. We then evaluated the effect of best hits from this first screen in a human reporter intestinal epithelial cell line (HT29^{luc}). Most metabolites activating AhR in HepG2^{luc} were also effective in HT29^{luc} and butyrate was also the most potent on these cells (Figure 1B).

Butyrate and AhR ligands act synergistically to activate AhR.

Serum of humans and mice has been shown to contain several indole compounds activating AhR (Jin et al., 2014; Rosser et al., 2020). Indeed fetal bovine serum (FBS) used for cell culture screens also contains AhR agonists, as demonstrated by its ability to activate HepG2^{luc} cells (Figure 1C). Targeted quantitative metabolomics confirmed the presence of indoles in mouse, human and fetal bovine serum (Figures S1A and S1B). Most indole derivatives retained AhR activity in the absence of FBS, but not butyrate (Figures 1D and 1E), suggesting that butyrate does not directly activate AhR but might synergize with indoles present in FBS.

To confirm this hypothesis, we combined SCFAs with known AhR agonists FICZ and indole acetic acid (IAA) on HepG2^{luc} and HT29^{luc} cells without FBS. We used the microbiota-derived IAA as we previously showed its decrease in IBD (Lamas et al., 2016) and metabolic syndrome (Natividad et al., 2018). FICZ is an endogenous photoproduct of Trp metabolism with a potent AhR-activity (Wincent et al., 2012). Butyrate, FICZ and IAA led to significant AhR activation on HepG2^{luc} cells, but synergistically increased when they were combined with butyrate (Figures 2A and 2B). Synergistic effect between SCFAs and FICZ or IAA was also observed for propionate (Figures S2A and S2B) and acetate (Figures S2C and S2D). A similar effect was observed on HT29^{luc} cells with butyrate

(Figures S3A and S3B) and propionate (Figures S3C and S3D), but not for acetate, except with the highest dose of FICZ (Figures S3E and S3F). The synergistic effect of combining butyrate with FICZ or IAA on AhR activation was also confirmed on *cyp1a1* (Figures 2C and 2D) and *ahrr* (Figures 2E and 2F) expression on conventional HepG2 and HT29 cell lines. Taken together, these results show that SCFAs, and particularly butyrate, synergize with Trp metabolites to activate AhR. To test the relevance of our results in humans, we treated healthy colonic explants from patients operated on for colorectal cancer with butyrate, FICZ or a combination of both. Induction of *cyp1a1* expression by FICZ was increased by co-treatment with butyrate (Figures 2G and 2H), confirming in primary cells the effect observed in cell lines.

Butyrate does not interact directly with AhR.

A recent *in silico* structural modeling study suggested that butyrate might bind to AhR (Marinelli et al., 2019). We tested the ability of SCFAs to physically bind to AhR using a radio-ligand binding assay in the murine hepatoma cells Hepa1c1c7. While low dose FICZ was highly effective to displace radiolabeled 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) from AhR, even high doses of butyrate, propionate, and acetate failed to do so (Figure 3A). Moreover, adding butyrate to a low dose of FICZ did not increase the displacement of TCDD compared to FICZ alone (Figure 3B). Thus, SCFAs are not AhR ligands.

We then investigated whether butyrate induces AhR nuclear translocation by immunofluorescence assay on human colonic epithelial cell line. FICZ induced nuclear translocation of AhR, but butyrate neither induced nuclear translocation by itself nor increased the nuclear translocation induced by FICZ (Figures 3C and 3D). Therefore, butyrate does not act on AhR nuclear translocation.

To assess if butyrate potentiates the formation of the AhR-ARNT dimer, we performed a co-immunoprecipitation experiment using anti-AHR antibody followed by immunoblotting with ARNT antibody. TCDD and FICZ, but not butyrate, induced the formation of AhR-ARNT heterodimers. Furthermore, adding butyrate to FICZ did not result in any changes in the formation of the AhR-ARNT complex (Figure 3E). Therefore, butyrate does not act on the formation of the AhR-ARNT heterodimer. Taken together, these results show that butyrate does act neither at the ligand-binding level nor at the nuclear translocation and heterodimerization level. We thus hypothesized that butyrate acts downstream of AhR-ARNT formation.

Butyrate does not act through indirect mechanisms.

The prototypic AhR target gene *cyp1a1* is involved in the metabolism of AhR ligands such as benzo- α -pyrene and FICZ (Guengerich, 2015; Schiering et al., 2017; Wincent et al., 2012). Thus, CYP1a1 inhibition is an indirect mechanism to activate AhR by interrupting the ligands' clearance (Wincent et al., 2012). We tested the ability of butyrate to inhibit the human recombinant CYP1a1. Unlike the classical CYP1a1 inhibitor α -naphthoflavone, butyrate did not induce any change in the activity of CYP1a1 compared to control (Figure S4A). Therefore, butyrate does not activate AhR by inhibiting CYP1a1-dependent clearance of ligands.

SCFAs are ligands of several G protein-coupled receptors (GPCRs), but their involvement in AhR activation is controversial (Marinelli et al., 2019; Yang et al., 2020). We explored if the GPCRs FFAR2, FFAR3 and HCAR2, known to be activated by SCFAs, were involved in the butyrate-mediated enhancement of AhR activity. We did not find any expression of

FFAR2 and FFAR3 on both HT29 and HepG2 cells (data not shown), ruling out the implication of these 2 receptors in butyrate-mediated activation of AhR. HCAR2 (GPR109A) expression was observed in both cell lines and induced by butyrate in HT29 cells (Figure S4B). To explore the role of HCAR2 in the synergistic effect, we treated HepG2^{luc} cells with butyrate or FICZ in the presence or absence of the HCAR2 antagonist mepenzolate bromide (MB). MB impacted neither FICZ nor butyrate combined with FICZ-mediated AhR activity (Figure S4C). HCAR2 is thus not involved in butyrate-mediated activation of AhR.

The ubiquitin-proteasome pathway degrades cellular proteins, including AhR, and inhibition of this pathway leads to nuclear translocation of AhR and nuclear accumulation of active AhR (Manasanch and Orłowski, 2017; Santiago-Josefat et al., 2001). As butyrate can act as a proteasome inhibitor (Yin et al., 2001), we tested if butyrate induced AhR activation by proteasome inhibition. The proteasome inhibitor MG132 increased neither FICZ-induced AhR activation nor the synergy between butyrate and FICZ (Figure S4D). Collectively, these data show that butyrate acts neither by CYP1a1 inhibition nor by GPCRs-dependent signaling or proteasome inhibition.

Butyrate acts on AhR via its inhibitory HDAC activity.

Butyrate is a potent HDAC inhibitor (iHDAC), which mediates several of its biological effects (Arpaia et al., 2013; Stilling et al., 2016). To explore the role of HDAC inhibition in the butyrate effect, we treated HepG2^{luc} cells with the iHDAC trichostatin A (TSA) in combination with FICZ. TSA recapitulated the effect of butyrate in enhancing FICZ-induced AhR activity, suggesting that butyrate acts through its iHDAC activity to activate

AhR (Figure 4A). To confirm this result and precisely investigate whether chromatin conformational changes induced by butyrate mediate AhR recruitment at target genes, we performed a ChIP assay targeting the promoter of the *cyp1a1* gene. Treatment of HepG2 cells with butyrate resulted in a time-dependent increase in the recruitment of AhR with a peak at 4H (Figure 4B). The combination of butyrate with FICZ induced an increase in the recruitment of AhR protein to the *cyp1a1* gene promoter (Figure 4C). To verify that the effect was not mediated by activation of the histone acetyltransferase (HAT) CBP/P300, cells were treated with C646, a HAT inhibitor, in combination with FICZ and butyrate. This combination did not lead to any change in the observed synergy (Figure 4D). Together, these results show that butyrate synergizes with AhR agonists through its iHDAC activity by facilitating the access of the AhR complex to its binding sites in the promoter of target genes.

DISCUSSION

In this study, we provide new insight into the regulation of the AhR activation by microbial metabolites and endogenous ligands in the gut. While gut-derived butyrate activates AhR, we have shown that it does not bind to the receptor. Instead, it alters the chromatin conformation of the promoter of target genes by inhibiting HDAC to favor the binding of AhR-ligand complex and the activation, leading to synergistic effects between butyrate and microbiota-derived bona fide AhR agonists.

Metabolites produced by the gut microbiota play a fundamental role in the crosstalk between the microbiota and the host. The huge microbial diversity of microorganisms in the gut produces metabolites with various structural diversity and effects. Importantly all these metabolites are present all together in the gut lumen, where they can interact with

each other and with host cells (Krautkramer et al., 2020). Several bacterial metabolites have previously been shown to activate AhR in vitro (Marinelli et al., 2019), but no studies have investigated their precise activity. The current study shows that the major SCFA butyrate synergizes with Trp-derived metabolites to activate AhR on intestinal and liver cells as well as on human intestinal tissues. We observed similar effects with other SCFAs propionate and acetate. However, we observed some differences in cell type-dependent activation, especially for acetate, which was more potent on the liver than intestinal cells. This seems logical as acetate is typically released into the bloodstream via the portal vein and reaches the liver, while butyrate is primarily absorbed and metabolized by the colonic epithelium (Fellows and Varga-Weisz, 2019).

Butyrate has recently been suggested to be an AhR ligand according to in silico molecular modeling (Marinelli et al., 2019). However, using radio-ligand binding assay, we showed that neither butyrate nor propionate or acetate, bind to AhR. Moreover, our analysis did not show any characteristics of AhR ligands for butyrate (receptor binding, nuclear translocation and dimerisation with ARNT) (Vyhlídalová et al., 2020), thus confirming that butyrate does not act as this way.

Several indirect mechanisms of activation exist for AhR. Class 1 CYPs degrade many drugs and some AhR ligands such as FICZ or benzo- α -pyrene (Guengerich, 2015; Wincent et al., 2012). Several molecules have been shown to be CYP1a1 inhibitors allowing to block the degradation of potent AhR agonists like FICZ, and thus increasing AhR activation (Manzella et al., 2018, 2020; Schiering et al., 2017; Wincent et al., 2012). Here, we showed in a cell-free assay that butyrate did not act as an inhibitor of CYP1a1 and that the synergy observed do not rely on it. Inhibition of AhR proteasomal degradation leads to a higher AhR pool in the cell and treatment with a proteasome inhibitor induces

AhR activation (Santiago-Josefat et al., 2001). It was shown that butyrate is a moderate proteasome inhibitor (Yin et al., 2001), but in our hands, proteasome inhibitors did not mimic the effects of butyrate on AhR activation.

Butyrate act both on HDACs and HATs. We showed that treatment of cells with butyrate led to increased binding of the AhR protein to the promoter of the human cyp1a1 target gene. Similar results were previously observed in mouse colonic cell line (YAMC) (Jin et al., 2017), but not in both Caco2 (Jin et al., 2017) and Hepa-1 cells (Schnekenburger et al., 2007). These conflicting results could be explained by a higher FBS concentration (20%) used in Caco2 cells compared to YAMC cells (5% FBS only) and by a too long exposure time (16H) for the experiments in Hepa-1 cells. Whereas these studies reported no increase in AhR recruitment at the cyp1a1 promoter when butyrate is combined with carcinogenic AhR ligands with high affinity such as TCDD or benzo- α -pyrene (Jin et al., 2017; Schnekenburger et al., 2007), we found an increase in AhR recruitment at the cyp1a1 promoter when butyrate was combined with endogenous AhR ligand FICZ. This difference could be explained by the nature of AhR ligand.

We showed that the iHDAC TSA recapitulates the synergistic effect of butyrate in the presence of an AhR ligand. We also showed that inhibition of HDAC by butyrate did not lead to activation of HATs, contrary to what has been published previously, and therefore that the synergy was only based on inhibition of HDAC (Wu et al., 2018). We cannot guarantee that butyrate acts only through promoter acetylation since many epigenetic modifications such as propionylation, butyrylation and crotonylation rely on HDAC (Fellows and Varga-Weisz, 2019). Epigenetics has been gaining momentum for several years due to its involvement in gene dynamics. There are 18 HDAC enzymes and some are known to be involved in certain pathological phenomena. For example, HDAC3

expression is reduced in intestinal epithelial cells of patients with IBD compared to healthy subjects (Alenghat et al., 2013), and mice lacking HDAC3 in intestinal epithelial cells develop spontaneous inflammation (Alenghat et al., 2013).

Besides butyrate and AhR agonists, a highly diverse and abundant amount of biologically active bacterial metabolites are found within the intestines. Future studies should focus on deciphering the interactions between different metabolites, especially those with epigenetic characteristics such as SCFAs.

In conclusion, we show that butyrate acts synergistically with endogenous microbiota-derived Trp ligands to increase AhR activity in mammals' cells. Systematic analysis of all potential mechanisms involved revealed that butyrate is not an AhR ligand. However, butyrate potentiates AhR activation by increasing AhR recruitment to the target gene promoter by a mechanism dependent on the inhibition of HDAC. These results support the existence of complex interactions between multiple gut-derived metabolites that deserve extensive exploration. Moreover, it opens the way to new therapies to modulate AhR activities in the gut, using live biotherapeutics products producing butyrate and indoles, or by directly using mixtures of metabolites or via strong AhR ligands produced by microbial metabolite mimicry (Dvořák et al., 2020).

Acknowledgments

The authors thank the patients recruited in the digestive surgery Department of Saint-Antoine Hospital (AP-HP, Paris, France), the nurses and Centre de Ressources biologiques (CRB) of Saint-Antoine Hospital. M.M was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and received funding from the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). Z.D. was supported by Czech Science Foundation, grant number

20-00449S. H.S. received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme (ERC-2016-StG-71577)

Author contributions

M.M. and H.S conceptualized the study, designed experiments and interpreted all the data. M.M. performed the majority of in vitro experiments, with assistance from N.R. and C.O. M.M. performed explant assay with assistance from J.H.L. and Y.P. P.E. performed metabolomics analysis. P.N. performed radioligand displacement assay. P.I. performed AhR translocation assay and AhR-ARNT coimmunoprecipitation assay. M.M. wrote the manuscript with input from N.R., S.M., Z.D. and H.S.; H.S supervised and acquired funding for the study.

Declaration of interests

HS report lecture fee, board membership, or consultancy from Carenity, AbbVie, Astellas, Danone, Ferring, Mayoly Spindler, MSD, Novartis, Roche, Tillots, Enterome, BiomX, Biose, Novartis, Takeda, Biocodex and is co-founder of Exeliom Biosciences.

JHL reports lecture fees from Ethicon, Takeda, Intuitive, B-Braun, invitation to a medical congress by Biomup, Intuitive and MD start. He is a consultant for Safeheal, Coloplast and FSK. He is a personal investor in 1 digital companies, medical device companies or biotech companies. Other authors declare no competing interests.

Main figure titles and legends

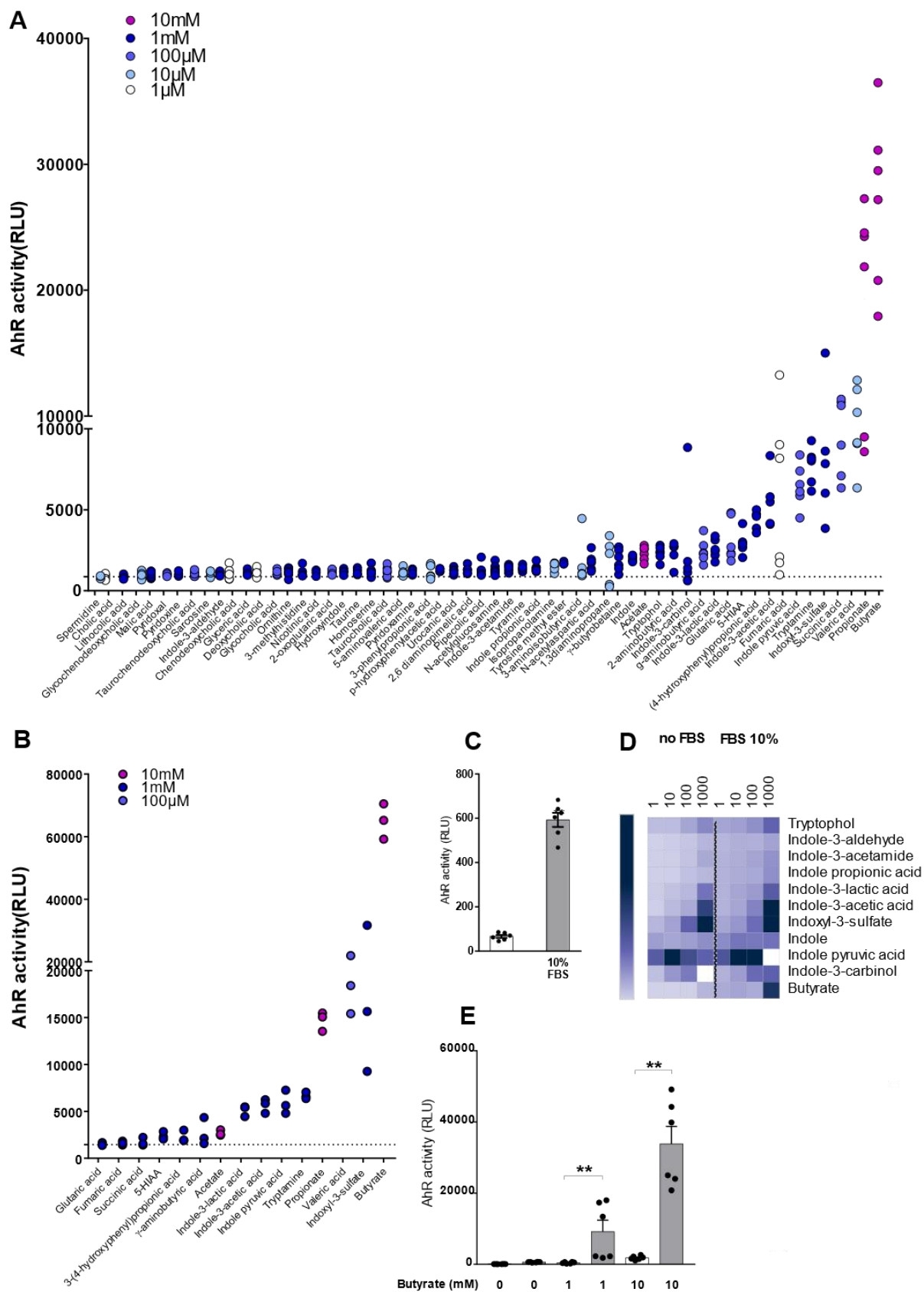


Figure 1: Several gut microbiota-dependent metabolites activate AhR

(A) HepG2^{luc} were treated for 24 hours with different doses of metabolites (1 μ M – 10mM). Results were normalized on the basis of negative luciferase activity of the control (unstimulated cells, dotted line) and cytotoxicity measurement and doses with the highest AhR activity without cell mortality are shown. Data are representative of two independent experiments

(B) HT29^{luc} were treated in triplicate for 24 hours with the metabolites having the highest AhR activity on HepG2^{luc}. Doses with the highest AhR activity without cell mortality are shown (dotted line: unstimulated cells) n=1

(C) AhR activity in HepG2^{luc} without (white) or with 10% FBS (gray) after 24 hours. Cells were treated in triplicate and data are presented as mean $\pm$ SEM of two independent experiments.

(D) Heat map representation of AhR activation in HepG2^{luc} treated in triplicate with L-trp metabolites and SCFAs (1 μ M – 1mM) with or without 10% FBS. Means RLU obtained in two independent experiments were represented and relative color graduation was attributed using Morpheus software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

(E) AhR activity obtained in HepG2^{luc} treated in triplicate with butyrate (1 and 10mM) without (white) or with (gray) 10% FBS. Data are presented as mean $\pm$ SEM of two independent experiments. *p< 0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001

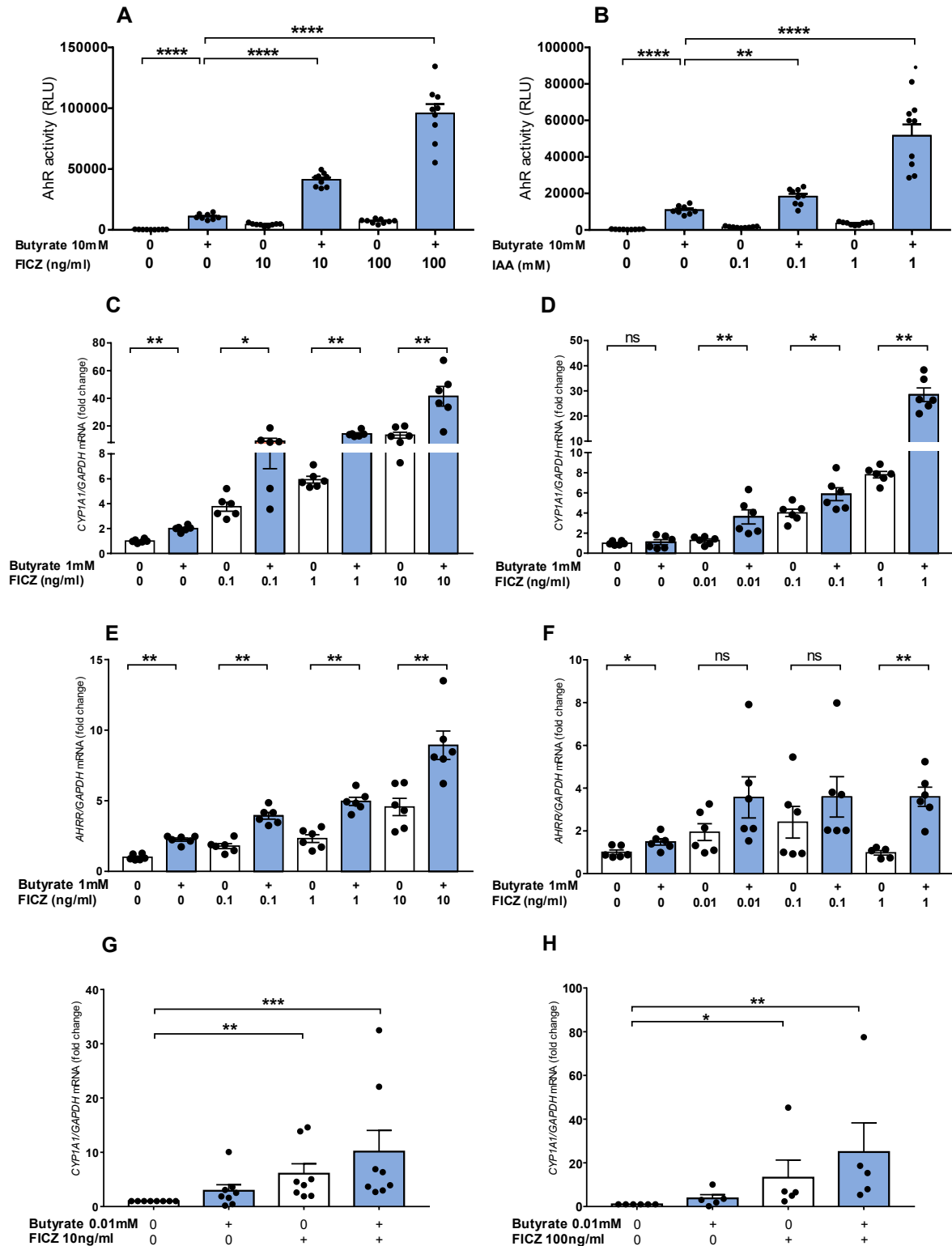


Figure 2: Butyrate and AhR ligands synergize to activate the AhR pathway

(A-B) AhR activity in HepG2luc treated in triplicate with butyrate (10mM) in combination with FICZ (10 and 100ng/ml) (A) or IAA (0.1 and 1mM) (B) in FBS-free media. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

(C-D) RT-qPCR analysis of CYP1A1 mRNA levels in HepG2 (C) and HT29 (D) treated with butyrate and/or FICZ.

(E-F) RT-qPCR analysis of AHRR mRNA levels in HepG2 (E) and HT29 (F) treated with butyrate and/or FICZ. Data are presented as mean $\pm$ SEM of two independent experiments.

(G-H) RT-qPCR analysis of CYP1A1 mRNA levels in colonic explants treated with butyrate (0.1 and 0.01mM) in combination with FICZ 10ng/ml (G) or 100ng/ml (H) for 24 hours. Data are expressed relative to *GAPDH* and presented as mean $\pm$ SEM. Each dot represents a patient. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

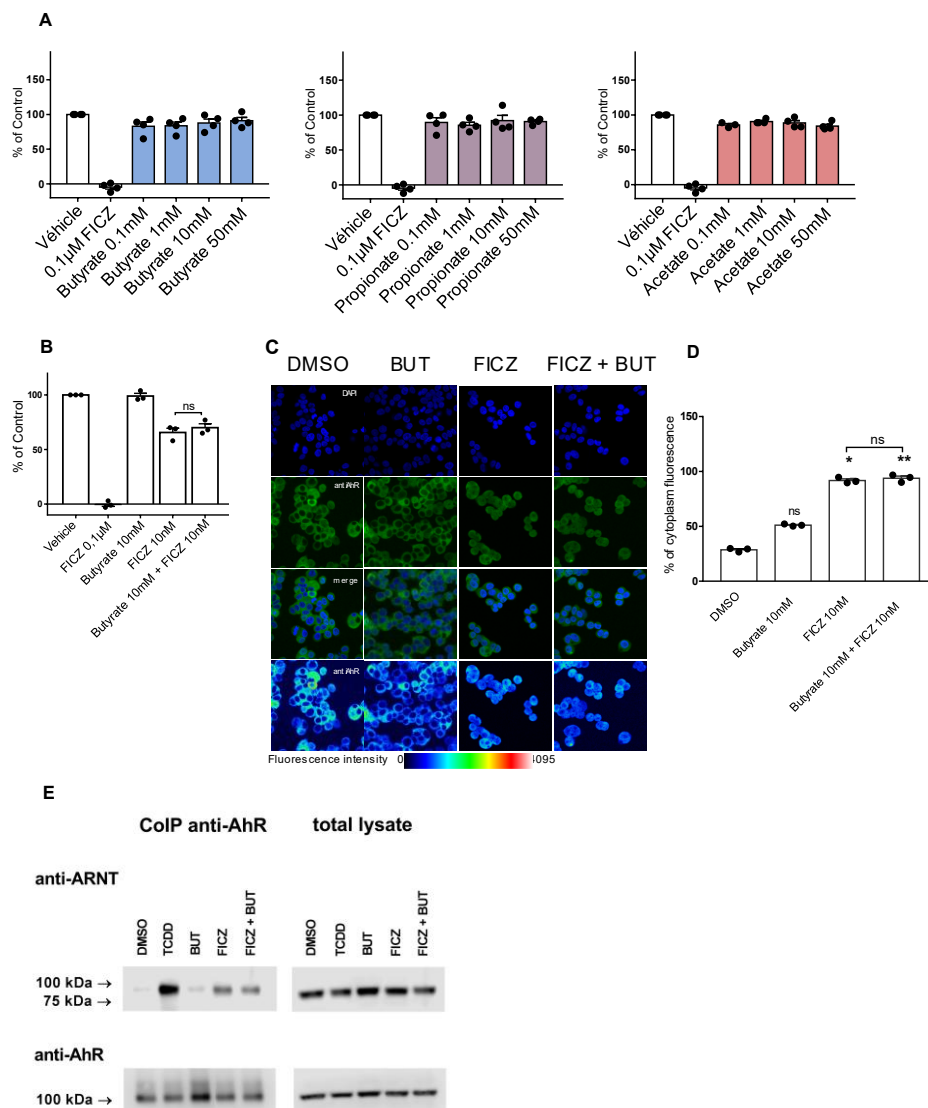


Figure 3 : Butyrate is not an AhR ligand

(A-B) Binding of SCFAs to AhR. Cytosolic protein extracts from Hepa1c1c7 (2 mg/mL) were incubated for 2 h with 2 nM [3H]-TCDD in the presence of butyrate (0.1 – 50mM), propionate (0.1 – 50mM), acetate (0.1 – 50mM) (A) or butyrate (10mM) with FICZ (0.1-10nM) (B). Ligand binding to the cytosolic proteins was determined by the hydroxyapatite binding protocol and scintillation counting. n=3

(C-D) Nuclear translocation of AhR. LS180 were treated for 90 min with vehicle (DMSO; 0.1% V/V), butyrate (10 mM), FICZ (10 nM) and FICZ combined with butyrate. Representative micrographs depicting subcellular localization of AhR visualized by AhR specific antibody (antiAhR) and nuclear staining by DAPI (C). Semi-quantitative estimation of nuclear translocation was expressed as a percentage of intensity of cytoplasm fluorescence. (D). * p<0.05

(E) Formation of AhR-ARNT heterodimers. LS180 were treated for 90 min with TCDD (10 nM), butyrate (10 mM), FICZ (10 nM) and combination of butyrate with FICZ. Cells were lysed and heterodimers were immunoprecipitated with AhR antibody followed by immunodetection using ARNT 1 antibody.

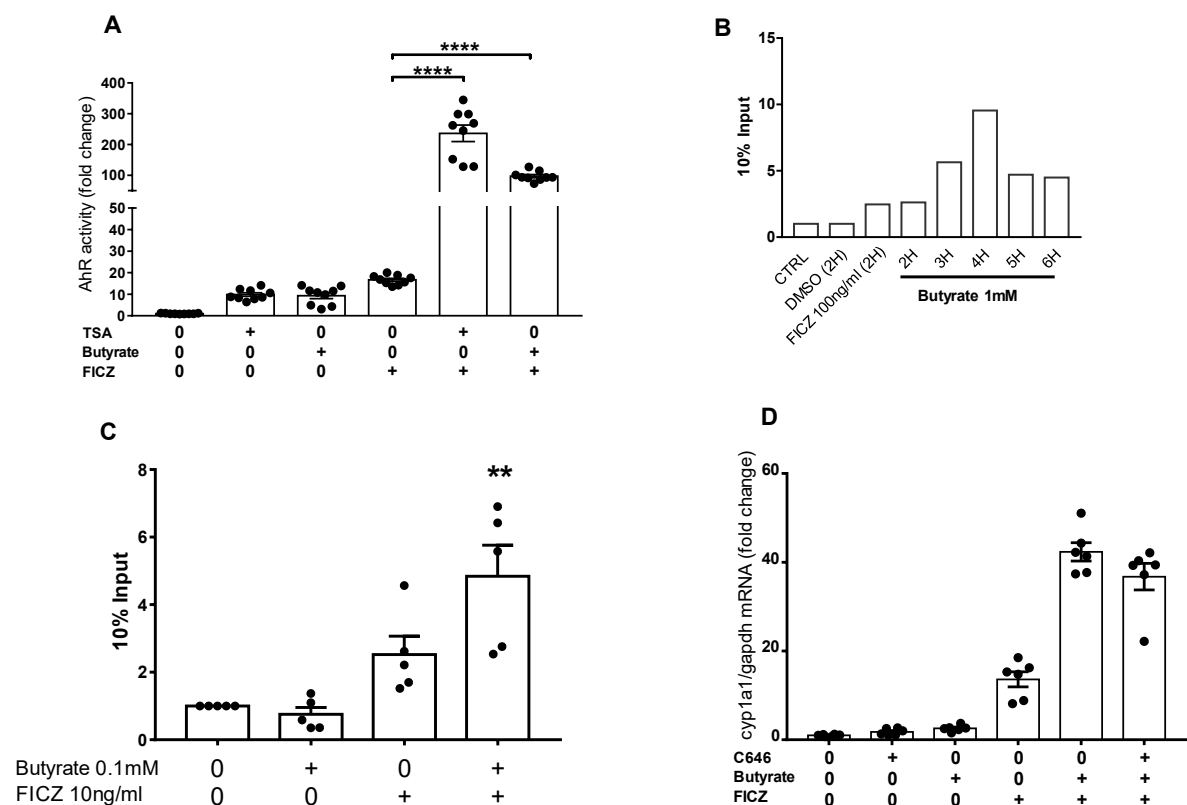


Figure 4: Butyrate acts through its iHDAC activity to activate AhR in synergy with AhR ligands

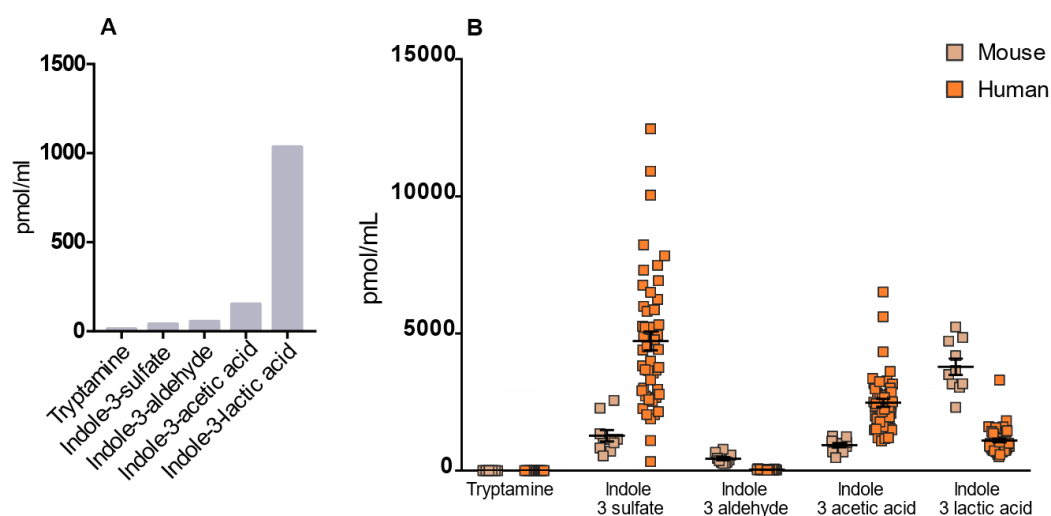
(A) AhR activity in HepG2^{luc} treated in triplicate with butyrate (1mM), FICZ (10ng/ml), TSA (100nM) or the combination of FICZ with butyrate or TSA in a FBS-free media for 24 hours. AhR activity was expressed as RLU relative to unstimulated cells and normalized with LDH. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ****p<0.0001

(B) AhR binding to the promoter region of the *CYP1A1* gene detected by ChIP-qPCR. HepG2 were treated with DMSO, FICZ (100ng/ml, positive control) and butyrate (1mM) for several time points. AhR binding was represented as % of input chromatin and compared with non-specific IgG binding. n=1

(C) Synergistic recruitment of AhR to the *CYP1A1* promoter mediated by butyrate in combination with FICZ. HepG2 were treated with FICZ (10ng/ml), butyrate (0.1mM) or FICZ with butyrate for 2 hours. AhR binding was represent as % of input chromatin and compared with non-specific IgG binding. Only experiments with an enrichment greater than or equal to 1.5 for FICZ were retained. Data are presented as mean $\pm$ SEM and each dot represent an independent experiment **p<0.01

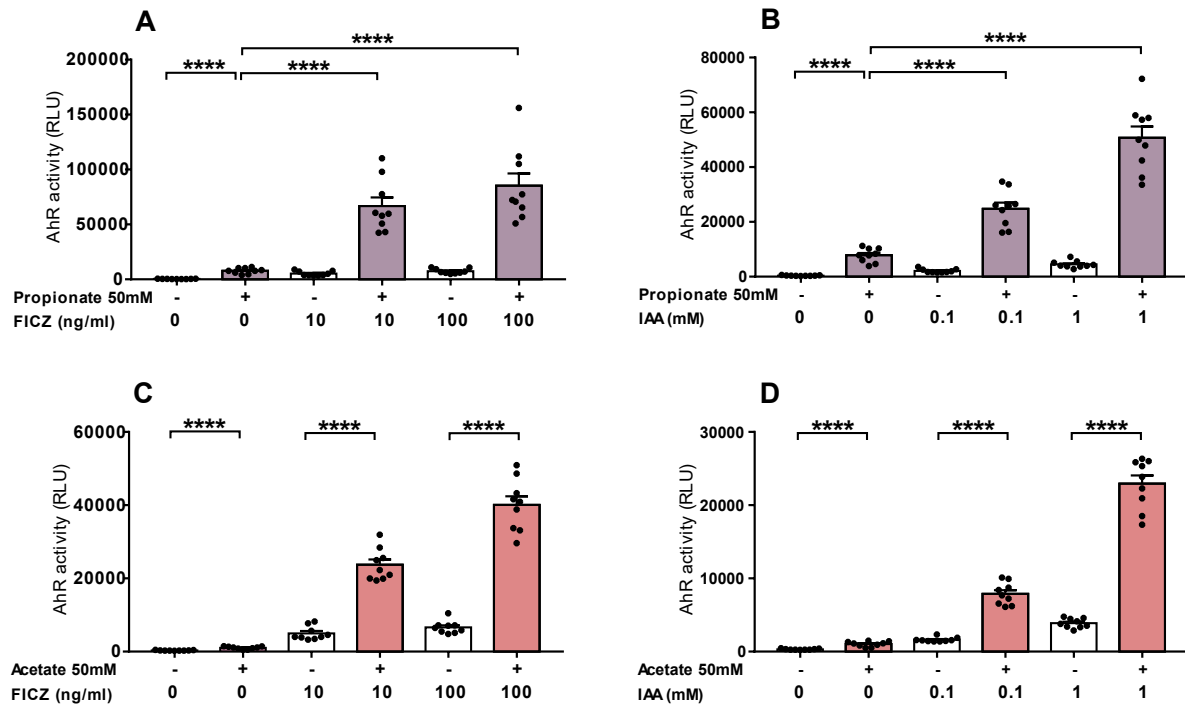
(D) Involvement of HAT inhibition in the synergistic process. HepG2 were treated in triplicate with butyrate (1mM), FICZ (10ng/ml), C646 (10 μ M) or the combination of FICZ with butyrate or C646 for 8 hours. *CYP1A1* mRNA levels are expressed relative to *GAPDH*. Data are presented as mean $\pm$ SEM of two independent experiments.

Supplemental figure titles and legends



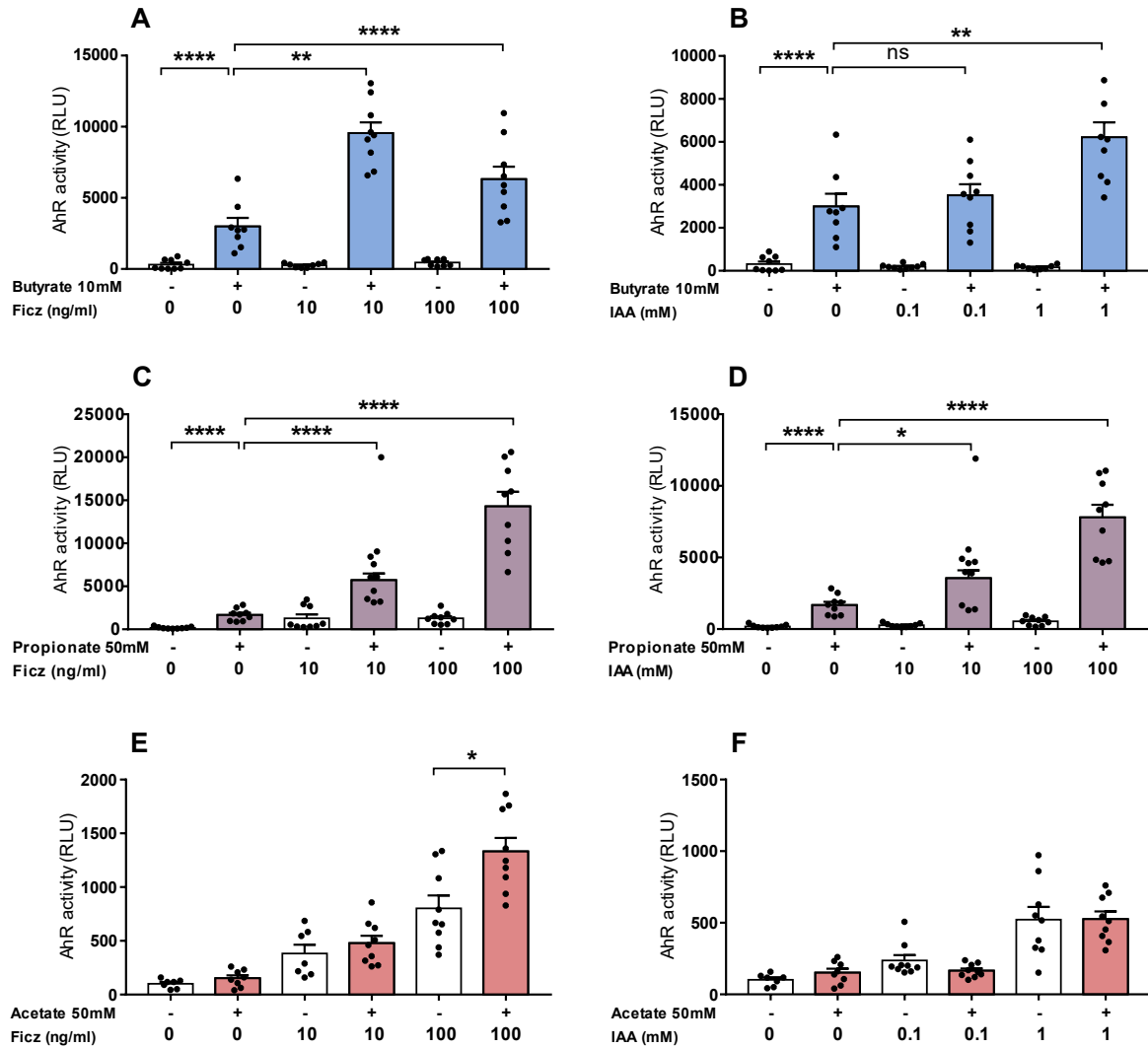
Supplementary figure 1: Fetal bovine serum enhances AhR activity

(A-B) Histogram representation of L-trp derivatives concentrations in the batch of FBS used (A), and in sera from mice (n = 10) and healthy subjects (n = 50) (B).



Supplementary figure 2: Synergistic effect is also observed for other SCFAs

Histogram representation of AhR activity mediated by propionate (A-B) and by acetate (C-D). HepG2^{luc} were treated with FICZ (10 and 100ng/ml), IAA (0.1 and 1mM), propionate (50mM, purple bars, A-B), acetate (50mM, orange bars, C-D) and with a combination of propionate with FICZ (A) or IAA (B) or of acetate with FICZ (C) or IAA (D) for 24 hours in FBS-free media. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ****p<0.0001



Supplementary Figure 3: Synergistic effect is also observed on intestinal cells

Histogram representation of AhR activity in intestinal cells. HT29luc were treated with FICZ (10 and 100ng/ml) or IAA (0,1 and 1mM) in combination with butyrate (10mM, blue bars) (A-B), propionate (50mM, purple bars) (C-D) or acetate (50mM, orange bars) (E-F) for 24 hours in a FBS-free media. Data are presented as mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ns: non significant * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to the Lead Contact, Harry SOKOL (harry.sokol@aphp.fr).

Materials availability

All requests for resources and reagents should be directed to the Lead Contact author.

Data and code availability

All data supporting the findings of this study are available within the paper and are available from the Lead Contact author upon request. This paper does not report original code.

Experimental Model and Subject Details

Cell Culture and Maintenance

HepG2 cells were grown in EMEM (ATCC, Cat#30-2003) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, batch# A10111-1158) and 1% (v/v) PenStrep (Sigma Aldrich, Cat#P4333). HT29 cells were grown in DMEM (Gibco, Cat#41965-039) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (PAA Laboratories GmbH, batch# A10111-1158), 1% (v/v) glutamine (Gibco, Cat#25030-081) and 1% (v/v) PenStrep (Sigma Aldrich, Cat#P4333). HepG2 lucia (HepG2^{luc}) cells were grown in EMEM (ATCC, Cat# 30-2003), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (PAA Laboratories GmbH, batch# A10111-1158), 1% (v/v) sodium pyruvate (Gibco, Cat#11360-039), 1% (v/v) L-glutamine (Gibco, Cat#25030-081), 1% (v/v) MEM non-essential amino acids (Gibco, Cat#11140-035), 1% (v/v) PenStrep (Sigma Aldrich, Cat#P4333), 100µg/mL normocin (Invivogen, Cat#ant-nr) and 100µg/ml zeocine (Invivogen, Cat#ant-zn). HT29 lucia cells (HT29^{luc}) were grown in DMEM supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (PAA Laboratories GmbH, batch# A10111-1158), 1% (v/v) sodium pyruvate (Gibco, Cat#11360-039), 1% (v/v) L-glutamine (Gibco, Cat#25030-081), 1% (v/v) MEM non-essential amino acids (Gibco, Cat#11140-035), 1% (v/v) PenStrep (Sigma Aldrich, Cat#P4333), 100µg/mL normocin (Invivogen, Cat#ant-nr) and 100µg/ml zeocine (Invivogen, Cat#ant-zn). LS180 cells were grown in DMEM (Sigma, Cat#D6546) supplemented with 10% (V/V) FBS (Sigma, Cat#F7524), 1% (V/V) L-glutamine (Serana, Cat#RGL-001) and 1% (V/V) MEM non-essential amino acids (Sigma, Cat#M7145).

All cells were kept in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ except for HT29 kept at 37°C with 10% CO₂.

Human subjects

All individuals with colorectal cancer (age 20-79) were recruited in the Digestive Surgery Department of the Saint Antoine Hospital (APHP, Paris France), provided informed consent and were included in a prospective biobank "BiomHost". Approval for human studies was obtained from the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France III, Am9098-3-3663-NI, on the 21/09/2019).

Reagents and antibodies

Sodium butyrate (Cat#303410), sodium propionate (Cat#P5436), sodium acetate (Cat#S2889), FICZ (Cat#SML1489), indole acetic acid (Cat#I3750), glyceric acid (Cat#51738), N-acetyl aspartic acid (Cat#00920), valeric acid (Cat#240370), 3-phenyl propionic acid (Cat#W288918), fumaric acid (Cat#47910), succinic acid (Cat#14079), malic acid (Cat#240176), 2-oxoglutaric acid (Cat#75890), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (Cat#H52406), cholic acid (Cat#C6445), γ -aminobutyric acid (Cat#A2129), 2-aminobutyric acid (Cat#162663), 5-aminovaleric acid (Cat#123188), homoserine (Cat#H6515), ornithine (Cat#02375), 2,6 diaminopimelic acid (Cat#D1377), tyrosine methyl ester (Cat#T90808), taurine (Cat#T0625), tyramine (Cat#T90344), urocanic acid (Cat#859796), γ -butyrobetaine (Cat#403245), N-acetylglucosamine (Cat#A8625), pyridoxal (Cat#271748), pyridoxamine (Cat#P9158), pyridoxine (Cat#P5669), sarcosine (Cat#131776), 1,3-diaminopropane (Cat#D23602), cadaverine (Cat#D22606), glutaric acid (Cat#G3407), hydroxyindole (Cat#H31859), spermidine (Cat#S2626), 5-hydroxyindole acetic acid (Cat#H8876), indole (Cat#I3408), indole 3 lactic acid (Cat#I5508), indole 3 pyruvic acid (Cat#I7017), tryptamine (Cat#193747), tryptophol

(Cat#T90301), indole 3 aldehyde (Cat#129445), indoxyl 3 sulfate (Cat#I3875), indole 3 carbinol (Cat#I7256), deoxycholic acid (Cat#30960), lithocholic acid (Cat#L6250), chenodeoxycholic acid (Cat#C9377), taurochenodeoxycholic acid (Cat#T6260), glycochenodeoxycholic acid (Cat#G0759), taurocholic acid (Cat#T40009), glycocholic acid (Cat#G1732), nicotinic acid (Cat#N4126), Mepenzolate bromide (Cat#M5651), MG132 (Cat#M8699), Trichostatine A (Cat#T8552) and C646 (Cat#382113) were purchased from Sigma Aldrich.

Method Details

Luciferase assay

HepG2^{luc} and HT29^{luc} cells were plated at a density of 20 000 and 50 000 cells per well respectively in a 96-wells plate. Cells were treated with increasing doses of metabolites (1µM – 10mM) for 24 hours. After stimulation, supernatant was used to determine luciferase activity by QUANTI-Luc™ assay according to the manufacturer's instructions and luminescence was measured with Spectra Max m5e (Molecular devices). Luciferase activity was normalized to LDH value measured by CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Unless otherwise indicated, results are shown as raw relative luminescence units (RLU) normalised with LDH. Cells were not used beyond the 20th passage according to the manufacturer's instructions.

LDH assay

Release of lactate dehydrogenase (LDH) was quantified using the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay according to the manufacturer's instructions. The

percentage of toxicity was calculated as (absorbance sample / absorbance control media).

L-trp metabolites measurements

L-trp and 20 L-trp metabolites were quantified by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry from FBS, murine and human serum as previously described (Lefèvre et al., 2019).

Human intestinal explants treatment

Intestinal margins resection from patients undergoing surgery for colorectal cancer were obtained from the digestive surgery department of St Antoine Hospital. After collection, intestinal resection was opened longitudinally and washed in RPMI Glutamax (Gibco, Cat#61870-010) supplemented with 10% FBS (PAA Laboratories GmbH, batch# A10111-1158), 1% v/v PenStrep (Sigma Aldrich, Cat#P4333), 50µg/ml gentamicin (Sigma Aldrich, Cat#G1264) and 0.25µg/ml amphotericine B (Sigma Aldrich, Cat#A2411). Mucosal samples (3 x 5 mm) were treated with several concentrations of sodium butyrate and/or FICZ for 24H at 37°C, 5% CO₂. Samples were placed in RNA later (Sigma Aldrich, Cat# R0901) for 48H and frozen at -80°C before RNA extraction.

Gene Expression Analysis by RT-qPCR

Trizol (Ambion, Cat#15596018) was used for the isolation of total RNA from cell lines (500,000 cells par well) and intestinal biopsies explants. DNase-treated RNAs were reverse transcribed with high-capacity cDNA RT kit (ThermoFisher Scientific,

Cat#4368814) for RT-qPCR. Specific cDNA was amplified for *CYP1A1* (Forward 5'-CAGCTCAGCTCAGTACCTC-3'; Reverse 5'-CTTGAGGCCCTGATTACCCA-3), *AHRR* (Forward 5'-GATGATGCTATCCTGGGGAGG-3'; Reverse 5'-CATCGTCATGAGTGGCTCG-3'), *hcar2* (Forward 5'-TTCAGAGAATGCGATTTAGGG-3'; Reverse 5'-GAAGCAAAAGTTTCAGATGCC-3') and *GAPDH* (Forward 5'-CAACGACCACTTTGTCAAGC-3'; Reverse 5'-TTCCTCTTGCTCTTGCTG-3'). qPCR assays were performed with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Cat.No. 4309155) and carried out on a StepOne Plus (Applied Biosystems) running with StepOne Plus Software. Relative quantification of *CYP1A1*, *AHRR* and *HCAR2* mRNA levels was expressed as fold-change, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with *GAPDH* as reference gene.

CYP1A1 inhibition assay

Human recombinant CYP1A1 expressed in baculovirus infected insect cells (BTI-TN-5B1-4) was used. Reactions (final volume 50 μ l) were performed in triplicate and contained 0.125 pmol CYP1A1, 100 mM KPO₄ (pH 7.4), 30 μ M Luc-CEE, varying concentrations of butyrate ranging from 0.1mM to 10mM, and NADPH regeneration system components. All components except the NADPH regeneration system were combined (25 μ l) and pre-incubated at room temperature (RT) for 10 min. The reactions were initiated by adding an equal volume of 2X NADPH regeneration system and incubated for 20 min at RT. Reactions were terminated by the addition of luciferin detection reagent (50 μ l) and incubated at RT for 20 min. Luminescence was recorded using a Spectra Max m5e (Molecular devices), and a control without CYP1A1 was subtracted from each measurement to account for background. CYP1A1 activity was taken as the percentage of the luminescence after incubation with vehicle.

Chromatin Immunoprecipitation

HepG2 cells (4 million per condition) were seeded in a 6 well plate in EMEM (ATCC, Cat#30-2003), and the following day they were incubated with DMEM, DMSO, FICZ (10ng/ml), butyrate (1mM), or the mixture of FICZ and butyrate (10ng/ml and 1mM respectively) for 180 minutes at 37°C. DNA-protein complexes were crosslinked by the addition of 80 µl 37% formaldehyde (Sigma Aldrich, Cat#252549) to 2 ml of media for 15 minutes at RT. Thereafter, 282 µl of 1M glycine (Sigma Aldrich, Cat#G7126) was applied for 5 minutes at RT. The cells were collected and rinsed twice with ice-cold PBS 1X. Pellets were lysed in 1 ml of ice-cold ChIP buffer (NaCl 150mM (Sigma Aldrich, Cat#S9888), Tris-HCl 50mM; pH 7,5 (Sigma Aldrich, Cat#10812846001), EDTA 5mM (Sigma Aldrich, Cat#EDS), NP-40 0.5% vol/vol (Sigma Aldrich, Cat#NP40S), Triton X-100 1% vol/vol (Sigma Aldrich, Cat#T8787), PMSF 0.5mM (Sigma Aldrich, Cat#P-7626) and leupeptin 10µg/ml (Sigma Aldrich, Cat#L-2884) followed by centrifugation (12,000g for 5 minutes at 4°C). Pellets were rinsed in 1 ml of ice-cold, followed by centrifugation (12,000g for 5 minutes at 4°C). The resulting pellets were resuspended in 200 µl of ChIP buffer and sonicated for 20 cycles (30sec ON – 30sec OFF) in a Bioruptor Pico (Diagenode). Cellular debris were removed by centrifugation (12,000g for 10 minutes at 4°C) and DNA concentration was determined in the supernatants using a Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). An aliquot of 20 µg of chromatin was resuspended in a total volume of 800 µl of ChIP buffer. 20µL was used for 10% Input and 200 µL was used for each immunoprecipitation (IP). IP was achieved by the addition of 5 µl of anti-AhR (D5S6H) antibody (Cell Signaling Technology, Cat#83200), 1 µl of normal rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Cat#2729) as the negative control and 1µL of H3 (D2B12) antibody (Cell signaling technology, Cat#4620) as the positive control. Samples were incubated

with rotation at 4°C overnight. The next day, 30 µl of Protein G Magnetic Beads were added and the samples were incubated for 2 hours at 4°C with rotation. Beads were briefly pelleted in magnetic separation rack Dynamag 2 (InvitroGen) and washed two times by 500µl of ChIP buffer. The pellets were resuspended in 150 µl of ChIP buffer and boiled for 10 minutes at 100° C with 1300 rpm shaking in the Thermomixer Comfort (Eppendorf). 1 µl of proteinase K (20µg/ml) was added and chromatin was incubated for 30 minutes at 55°C Thermomixer Comfort (Eppendorf). Samples were boiled again for 10 minutes at 100°C with 400 rpm shaking. After separation in the magnetic rack, chromatin was purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Machinerey-Nagel, Cat#740609) according to the manufacturer protocol and was used for quantitative PCR in SteponeOne Plus (Applied Biosystems). Then, 2 µl of DNA were used in the qPCR reaction together with nuclease-free water, SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Cat#4368814), and 5µM *CYP1A1* promoter primers (5'-AGCTAGGCCATGCCAAAT-3' and 5'-AAGGGTCTAGGTCTGCGTGT-3') as described previously (Stepankova et al., 2018). The qPCR program was as follows: enzyme activation at 95°C for 3 minutes and denaturation with annealing and elongation for 40 cycles at 95°C for 15 seconds and at 60°C for 60 seconds for 40 cycles. Then, the 10% input method was applied and the results were expressed as fold enrichment next to non-treated sample.

Radio-Ligand Binding Assay

Cytosolic protein extracts from murine hepatoma Hepa1c1c7 cells (2 mg/mL) were incubated for 2 h at room temperature with 2 nM [3H]-TCDD in the presence of butyrate (0.1 – 50mM), propionate (0.1 – 50mM), acetate (0.1 – 50mM), FICZ (100 nM; positive

control), or vehicle (DMSO; 0.1% V/V; corresponds to specific binding of [3H]-TCDD = 100%). Additionally, combined incubation of protein extracts with 2 nM [3H]-TCDD, 10 mM butyrate and 10 nM FICZ was performed. Ligand binding to the cytosolic proteins was determined by the hydroxyapatite binding protocol and scintillation counting as described elsewhere (Denison et al., 2002). Specific binding of [3H]-TCDD was determined as a difference between total and non-specific (TCDF; 200 nM) reactions. Three independent experiments were performed, and the incubations and measurements were done in triplicates in each experiment (technical replicates).

Protein Co-Immunoprecipitation of the AhR-ARNT

Colonic epithelial cell line LS180 were treated with a vehicle (DMSO; 0.1% V/V), positive control (TCDD; 10 nM), butyrate (10 mM), FICZ (10 nM) and combination of butyrate (10 mM) and FICZ (10 nM) for 90 min. Cells were lysed and Pierce™ Co-Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat# 26149) with covalently bound AhR antibody (Santa Cruz Biotechnology, Cat#sc-133088) was used for co-immunoprecipitation of AhR-ARNT heterodimers. Eluted protein complexes, in parallel with parental total lysates, were resolved in SDS-PAGE gels followed by Western blot and immunodetection with ARNT 1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Cat#sc-17812). Chemiluminescent detection was performed using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (Cell Signaling Technology, Cat#7076S) and WesternSure® PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR Biotechnology) by C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biotechnology). Subsequently, the blots were stripped using Re-Blot Plus Strong Solution (Millipore) and the AhR was immunodetected with AhR antibody and the same

chemiluminescent procedure. The experiments were performed in two consecutive cell passages

Immunofluorescence detection of the AhR nuclear translocation

LS180 (90,000 cells/well) were grown on poly-D-lysine coated 8-well tissue culture chamber slides (Sarstedt) overnight. The cells were incubated with a vehicle (DMSO; 0.1% V/V), butyrate (10 mM), FICZ (10 nM) and combination of butyrate (10 mM) and FICZ (10 nM) for 90 min. After the treatment, the cells were washed with PBS, fixed with 4% (V/V) formaldehyde, permeabilized using 0.1% (V/V) Triton X-100, blocked with 3% (m/V) bovine serum albumin and incubated with Alexa Fluor 488 labelled primary antibody against AhR (Santa Cruz Biotechnology, Cat#sc-133088), as described elsewhere (Stepankova et al., 2018). Nuclei were stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) and the slides were sealed by coverslips using VectaShield® Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories). The AhR nuclear translocation was observed using Olympus Fluoview 1000 confocal system (Olympus); near UV laser (405 nm) for excitation of DAPI and Ar laser (488 nm) for excitation of Alexa Fluor 488. The experiments were performed in three consecutive cell passages. The level of AhR nuclear translocation was calculated as the proportion of fluorescence intensity of nucleus and fluorescence intensity of cytoplasm (fluorescence of nucleus / fluorescence of cytoplasm) and was expressed as a percentage of intensity of cytoplasm fluorescence. The level of nuclear translocation of AhR was estimated in 80-110 cells for every treatment in each experiment.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software (www.graphpad.com). Mann Whitney test was used to compare two groups. Ordinary one-way ANOVA test was used to compare 3 groups. For ChIP experiment, One-way ANOVA corrected by the false discovery rate method of Benjamini and Hochberg was performed. P value of < 0.05 was considered significant, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$

REFERENCES

- Agus, A., Planchais, J., and Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* 23, 716–724.
- Agus, A., Clément, K., and Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut* 70, 1174–1182.
- Alenghat, T., Osborne, L.C., Saenz, S.A., Kobuley, D., Ziegler, C.G.K., Mullican, S.E., Choi, I., Grunberg, S., Sinha, R., Wynosky-Dolfi, M., et al. (2013). Histone deacetylase 3 coordinates commensal-bacteria-dependent intestinal homeostasis. *Nature* 504, 153–157.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2011). Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* 331, 337–341.
- Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43, 309–334.
- Denison, M.S., Rogers, J.M., Rushing, S.R., Jones, C.L., Tetangco, S.C., and Heath-Pagliuso, S. (2002). Analysis of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signal transduction pathway. *Curr Protoc Toxicol* Chapter 4, Unit4.8.
- Dvořák, Z., Sokol, H., and Mani, S. (2020). Drug Mimicry: Promiscuous Receptors PXR and AhR, and Microbial Metabolite Interactions in the Intestine. *Trends in Pharmacological Sciences* 41, 900–908.
- Fellows, R., and Varga-Weisz, P. (2019). Chromatin dynamics and histone modifications in intestinal microbiota-host crosstalk. *Mol Metab* 38.
- Guengerich, F.P. (2015). Human Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, P.R. Ortiz de Montellano, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 523–785.
- Jin, U.-H., Lee, S.-O., Sridharan, G., Lee, K., Davidson, L.A., Jayaraman, A., Chapkin, R.S., Alaniz, R., and Safe, S. (2014). Microbiome-Derived Tryptophan Metabolites and Their Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Agonist and Antagonist Activities. *Mol Pharmacol* 85, 777–788.
- Jin, U.-H., Cheng, Y., Park, H., Davidson, L.A., Callaway, E.S., Chapkin, R.S., Jayaraman, A., Asante, A., Allred, C., Weaver, E.A., et al. (2017). Short Chain Fatty Acids Enhance Aryl Hydrocarbon (Ah) Responsiveness in Mouse Colonocytes and Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *Scientific Reports* 7, 10163.
- Korecka, A., Dona, A., Lahiri, S., Tett, A.J., Al-Asmakh, M., Braniste, V., D'Arienzo, R., Abbaspour, A., Reichardt, N., Fujii-Kuriyama, Y., et al. (2016). Bidirectional communication between the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and the microbiome tunes host metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2, 16014.
- Krautkramer, K.A., Fan, J., and Bäckhed, F. (2020). Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature Reviews Microbiology* 1–18.
- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat Med* 22, 598–605.
- Lamas, B., Hernandez-Galan, L., Galipeau, H.J., Constante, M., Clarizio, A., Jury, J., Breyner, N.M., Caminero, A., Rueda, G., Hayes, C.L., et al. (2020). Aryl hydrocarbon receptor ligand production by the

gut microbiota is decreased in celiac disease leading to intestinal inflammation. *Science Translational Medicine* 12.

Lavelle, A., and Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 17, 223–237.

Lefèvre, A., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Attucci, S., Dufour, D., Sokol, H., and Emond, P. (2019). Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta* 195, 593–598.

Manasanch, E.E., and Orlowski, R.Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 14, 417–433.

Manzella, C., Singhal, M., Alrefai, W.A., Saksena, S., Dudeja, P.K., and Gill, R.K. (2018). Serotonin is an endogenous regulator of intestinal CYP1A1 via AhR. *Sci Rep* 8.

Manzella, C.R., Ackerman, M., Singhal, M., Ticho, A.L., Ceh, J., Alrefai, W.A., Saksena, S., Dudeja, P.K., and Gill, R.K. (2020). Serotonin modulates AhR activation by interfering with CYP1A1-mediated clearance of AhR ligands. *Cell. Physiol. Biochem.* 54, 126–141.

Marinelli, L., Martin-Gallausiaux, C., Bourhis, J.-M., Béguet-Crespel, F., Blottière, H.M., and Lapaque, N. (2019). Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells. *Scientific Reports* 9, 643.

Martin-Gallausiaux, C., Larraufie, P., Jarry, A., Béguet-Crespel, F., Marinelli, L., Ledue, F., Reimann, F., Blottière, H.M., and Lapaque, N. (2018). Butyrate Produced by Commensal Bacteria Down-Regulates Indolamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO-1) Expression via a Dual Mechanism in Human Intestinal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* 9.

Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y., and Benno, Y. (2012). Impact of Intestinal Microbiota on Intestinal Luminal Metabolome. *Sci Rep* 2.

Modoux, M., Rolhion, N., Mani, S., and Sokol, H. (2021). Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target. *Trends in Pharmacological Sciences* 42, 60–73.

Morais, L.H., Schreiber, H.L., and Mazmanian, S.K. (2021). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol* 19, 241–255.

Natividad, J.M., Agus, A., Planchais, J., Lamas, B., Jarry, A.C., Martin, R., Michel, M.-L., Chong-Nguyen, C., Roussel, R., Straube, M., et al. (2018). Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*.

Reigstad, C.S., Salmonson, C.E., Rainey, J.F., Szurszewski, J.H., Linden, D.R., Sonnenburg, J.L., Farrugia, G., and Kashyap, P.C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J* 29, 1395–1403.

Rosser, E.C., Piper, C.J.M., Matei, D.E., Blair, P.A., Rendeiro, A.F., Orford, M., Alber, D.G., Krausgruber, T., Catalan, D., Klein, N., et al. (2020). Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells. *Cell Metab.* 31, 837–851.e10.

Santiago-Josefat, B., Pozo-Guisado, E., Mulero-Navarro, S., and Fernandez-Salguero, P.M. (2001). Proteasome Inhibition Induces Nuclear Translocation and Transcriptional Activation of the Dioxin Receptor in Mouse Embryo Primary Fibroblasts in the Absence of Xenobiotics. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1700–1709.

Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., and Bäckhed, F. (2013). Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metabolism* 17, 225–235.

Schiering, C., Wincent, E., Metidji, A., Iseppon, A., Li, Y., Potocnik, A.J., Omenetti, S., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Nebert, D.W., et al. (2017). Feedback Control of AHR Signaling Regulates Intestinal Immunity. *Nature* 542, 242–245.

Schnekenburger, M., Peng, L., and Puga, A. (2007). HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated trans-activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 569–578.

Stepankova, M., Bartonkova, I., Jiskrova, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., and Dvorak, Z. (2018). Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol Pharmacol* 93, 631–644.

Stilling, R.M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International* 99, 110–132.

Vyhliđalová, B., Krasulová, K., Pečinková, P., Marcalíková, A., Vrzal, R., Zemánková, L., Vančo, J., Trávníček, Z., Vondráček, J., Karasová, M., et al. (2020). Gut Microbial Catabolites of Tryptophan Are Ligands and Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor: A Detailed Characterization. *Int J Mol Sci* 21.

Wincent, E., Bengtsson, J., Bardbori, A.M., Alsberg, T., Luecke, S., Rannug, U., and Rannug, A. (2012). Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 4479–4484.

Wrzosek, L., Ciocan, D., Hugot, C., Spatz, M., Dupeux, M., Houron, C., Moal, V.L.-L., Puchois, V., Ferrere, G., Trainel, N., et al. (2021). Microbiota tryptophan metabolism induces aryl hydrocarbon receptor activation and improves alcohol-induced liver injury. *Gut* 70, 1299–1308.

Wu, J., Jiang, Z., Zhang, H., Liang, W., Huang, W., Zhang, H., Li, Y., Wang, Z., Wang, J., Jia, Y., et al. (2018). Sodium butyrate attenuates diabetes-induced aortic endothelial dysfunction via P300-mediated transcriptional activation of Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine* 124, 454–465.

Yang, W., Yu, T., Huang, X., Bilotta, A.J., Xu, L., Lu, Y., Sun, J., Pan, F., Zhou, J., Zhang, W., et al. (2020). Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nature Communications* 11, 4457.

Yano, J.M., Yu, K., Donaldson, G.P., Shastri, G.G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C.R., Ismagilov, R.F., Mazmanian, S.K., and Hsiao, E.Y. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161, 264–276.

Yin, L., Laevsky, G., and Giardina, C. (2001). Butyrate Suppression of Colonocyte NF- κ B Activation and Cellular Proteasome Activity. *J. Biol. Chem.* 276, 44641–44646.

Zierer, J., Jackson, M.A., Kastenmüller, G., Mangino, M., Long, T., Telenti, A., Mohnsey, R.P., Small, K.S., Bell, J.T., Steves, C.J., et al. (2018). The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nat Genet* 50, 790–795.

Tryptophan metabolism as a pharmacological target

Author(s): Morgane Modoux^{1,2}, Nathalie Rolhion^{1,2}, Sridhar Mani³, Harry Sokol^{1,2,4,*}

¹ Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Gastroenterology Department, F-75012 Paris, France

² Paris Centre for Microbiome Medicine FHU, Paris, France

³ Molecular Pharmacology, Genetics and Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

⁴ INRA, UMR1319 Micalis & AgroParisTech, Jouy en Josas, France



Review

Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target

Morgane Modoux,^{1,2} Nathalie Rolhion,^{1,2} Sridhar Mani,³ and Harry Sokol^{1,2,4,*}

L-Tryptophan is an essential amino acid required for protein synthesis. It undergoes an extensive and complex metabolism along several pathways, resulting in many bioactive molecules acting in various organs through different action mechanisms. Enzymes involved in its metabolism, metabolites themselves, or their receptors, represent potential therapeutic targets, which are the subject of dynamic research. Disruptions in L-tryptophan metabolism are reported in several neurological, metabolic, psychiatric, and intestinal disorders, paving the way to develop drugs to target it. This review will briefly describe L-tryptophan metabolism and present and discuss the most recent pharmacological developments targeting it.

Introduction

L-Tryptophan (L-Trp) is an essential amino acid required for protein biosynthesis. It is also a biochemical precursor of metabolites that significantly affect mammalian physiology, including gastrointestinal functions, immunity, metabolism, and the nervous system. In the gastrointestinal tract L-Trp metabolism can follow three significant pathways, all of which are influenced by the gut microbiota: (i) the kynurenine pathway (KP) in both immune and epithelial cells, (ii) the **serotonin** (5-hydroxytryptamine, **5-HT**; see [Glossary](#)) production pathway in enterochromaffin cells (ECs), a specialized subtype of intestinal epithelial cell, and (iii) direct transformation by the gut microbiota of L-Trp into several molecules, including ligands of the **aryl hydrocarbon receptor (AhR)** ([Figure 1](#)). Enzymes involved in these pathways, metabolites themselves, or their receptors represent therapeutic targets. Alterations in L-Trp metabolism have been reported recently in several neurological, metabolic, psychiatric, and intestinal diseases, paving the way for developing drugs to target it. Here, we will discuss in particular: (i) inhibitors of enzymes of the KP and analogs of neuroprotective metabolites, (ii) antagonists of 5-HT peripheral receptors and inhibitors of 5-HT synthesis, (iii) different strategies to target AhR via agonists or antagonists, (iv) direct administration of L-Trp metabolites, and (v) the use of live biotherapeutic products for the potential exploitation of their enzymatic machinery in modulating L-Trp metabolism.

Tryptophan Metabolism

Host Tryptophan Metabolism

In mammalian cells, most L-Trp is metabolized via the KP, while the remainder is utilized in the synthesis of 5-HT and melatonin (MT). In KP, L-Trp is catabolized into the unstable derivative N-formyl-L-kynurenine (NFK) by rate-limiting enzymes **tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)** and **indoleamine 2,3-dioxygenases (IDO1/IDO2)** ([Figure 1](#)). Globally, the enzymes of KP are expressed in a tissue-specific manner. *TDO* is expressed in the liver, whereas *IDO1* is expressed in many cell types and tissues and is inducible by cytokines [1]. NFK is rapidly metabolized by kynurenine formamidase (expressed in liver, kidney, and brain) to form L-kynurenine (L-kyn). L-kyn is a crucial metabolite with potent immunoregulatory functions through its binding to AhR [1–3]. L-kyn is mainly metabolized by **kynurenine monooxygenase (KMO)** to form 3-hydroxykynurenine (3-HK). 3-HK is then degraded to 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) by **kynureninase (KYNU)**. KYNU is subsequently metabolized to 2-amino-3-carboxymuconic 6-semialdehyde (ACMS) by 3-

Highlights

L-Tryptophan (L-Trp) is metabolized via three pathways: the indole pathway in bacteria and the kynurenine and serotonin pathways in mammalian cells.

Disruptions in L-Trp metabolism are reported in several diseases making L-Trp metabolism a promising therapeutic target.

Manipulating L-Trp metabolism is an attractive therapeutic strategy.

Key enzymes of L-Trp metabolism are targets of inhibitors currently undergoing clinical trials in cancerology, dermatology, and gastroenterology.

Serotonin and aryl hydrocarbon receptor (AhR) receptors are targeted in the treatment of gastrointestinal diseases, inflammation, and many cancers.

Next-generation probiotics producing indoles are being developed for their ability to activate AhR in the gut.

¹Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Gastroenterology Department, F-75012 Paris, France

²Paris Centre for Microbiome Medicine FHU, Paris, France

³Molecular Pharmacology, Genetics and Medicine, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

⁴INRA, UMR1319 Micalis & AgroParisTech, Jouy en Josas, France

*Correspondence: harry.sokol@aphp.fr (H. Sokol).



hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase (3-HAO). The former is expressed in the liver, kidney, central nervous system (CNS), and placenta, while the latter has a broad tissue distribution [3]. ACMS can be cyclized to quinolinic acid (QUIN) or metabolized by the enzyme 2-amino-3-carboxymuconate-semialdehyde decarboxylase (ACMSD), found mainly in the kidney and to a lesser extent in the liver, and responsible for the synthesis of 2-aminomuconic-6-semialdehyde (AMS). AMS is either metabolized by 2-aminomuconic semialdehyde dehydrogenase (AMSD) to result in acetyl-CoA or cyclized nonenzymatically to form picolinic acid (PICA). In the CNS, QUIN is mainly produced by microglia. It acts as a neurotoxic agent on astrocytes mainly by its selective agonist effect on ionotropic glutamate glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Figure 2). However, mechanisms determining the engagement of KP in its synthesis remain undetermined [4,5]. QUIN is also a precursor for the *de novo* synthesis pathway for NAD via the enzyme **quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT)** expressed mainly in the liver and kidney. NAD is a cofactor for numerous enzymes involved in cellular energy metabolism, adaptive responses of cells to bioenergetic and oxidative stress, and genome stability. Its deficiency affects tissues that need high cellular energy, such as the brain, gut, and skin, causing pellagra [6]. Finally, PICA is a neuroprotective molecule whose concentration is reduced in the serum of patients with autism, and plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of subjects who have attempted suicide [7,8].

Hepatic and cerebral **kynurenine aminotransferase (KAT)** synthesizes kynurenic (KYNA) and xanthurenic acid (XANA) from L-kyn and 3-HK, respectively [3]. Four KATs have been identified in the mammalian brain (KAT I–IV), but KAT II activity accounts for the highest proportion (60%) of the total KAT activity in the mammalian brain [9]. KYNA is a neuroprotective metabolite that acts as an AhR ligand and has an antagonist effect on NMDA and α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionate (AMPA) receptors [3]. It also participates in tissue homeostasis and inflammation regulation via its binding to the orphan receptor GPR35 [10,11]. KYNA has been reported to antagonize the α -7 acetylcholine receptor, but this effect remains controversial [12]. Its structural analog XANA acts on AhR and the metabotropic glutamate receptors mGlu2 and mGlu3 [13].

The KP is organized with several intersections, and the flux through various routes with the KP is not equal. This means that the production of different end-products of KP, such as KYNA, XANA, PICA, or QUIN, is not identical, and the balance between them can change according to the situation.

The remaining L-Trp not metabolized in KP leads to intestinal and cerebral 5-HT production through the **Trp hydroxylase (TPH)** enzymes. More than 90% of 5-HT is produced in the gut, particularly in ECCs through TPH1, the activity of which is modulated by intestinal microbiota [14–16]. Synthesis of 5-HT at the central level is carried out via the enzyme TPH2. 5-HT is an important gastrointestinal signaling molecule that conveys signals from the gut to intrinsic or extrinsic neurons and influences intestinal peristalsis, motility, secretion, vasodilatation, and nutrient absorption. Thus, it represents an attractive target for the treatment of several intestinal disorders. 5-HT can be metabolized secondarily to MT, a circadian hormone promoting sleep, but also has anti-inflammatory properties [17].

Microbial Tryptophan Metabolism

Intestinal microorganisms metabolize unabsorbed L-Trp into several molecules, such as indole derivatives [indole-3-aldehyde (IAld), indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-propionic acid (IPA), indole-3-acetaldehyde (IAAld), indole-3-lactic acid (ILA), and indole acrylic acid] but also tryptamine and skatole. These metabolites are involved in intestinal permeability, regulation of inflammation, and host immunity [18–24]. Several of these metabolites are ligands for AhR

Glossary

Aryl hydrocarbon receptor (AhR):

the AhR transcription factor belongs to the basic helix-loop-helix (bHLH) – Per-Arnt-Sim (PAS) family involved in environment sensing. Cytoplasmic in the basal state, it translocates in the nucleus after fixation of a ligand to induce the transcription of target genes including the cytochromes (cyp) 1a1, 1a2 and 1b1. Pharmacological duality according to the immune or cancerous nature of the pathology to be treated.

Indoleamine 2,3-dioxygenase

(IDO) 1: ubiquitous and nonspecific enzyme that catabolizes L-Trp into NFK. IDO1 is inducible by proinflammatory stimuli. Pharmacological target in cancers.

Kynureninase (KYNU): enzyme expressed mainly in the liver and kidneys and responsible for the metabolism of 3-HK to 3-HAA.

Kynurenine aminotransferase (KAT):

enzyme which metabolizes L-kyn and 3-HK to KYNA and XANA, respectively. Unlike other KP enzymes, KAT expression decreases in response to inflammatory stimuli favoring the shift of KP toward the production of neurotoxic QUIN. Promising target in schizophrenia where the increase in KYNA leads to the hypofunction of glutamatergic transmission.

Kynurenine monooxygenase (KMO):

catalyzes the hydroxylation of L-kyn to form 3-HK. Absent from astrocytes but predominant in microglia where it actively participates in the synthesis of precursors of the neurotoxic metabolite QUIN. Promising target in neurodegenerative diseases to stop the synthesis of deleterious metabolites (3-HK and QUIN).

Probiotics: microorganisms which, when administered live and in adequate amounts to the host, bring beneficial health effects [World Health Organization (WHO)].

Quinolinate

phosphoribosyltransferase (QPRT):

enzyme responsible for the conversion of the neurotoxic QUIN to coenzyme NAD involved in numerous reactions of energy and tissue homeostasis. The administration of recombinant QPRT could overcome the rapid saturation of the endogenous enzyme and remove the excess of QUIN.

Serotonin (5-HT):

endogenous monoamine involved in a wide range of physiological processes such as behavior, vascular function, hemostasis,

[24,25]. Of note, it was recently shown that some of these molecules are not only synthesized by microbiota, but also by tumor cells through the effect of an L-amino acid oxidase, IL-4-induced-1 (IL-4I1), metabolizing L-Trp into indole-3-pyruvic acid and subsequently into IAA, IAld, and ILA, thus allowing escape from the immune system, survival, and tumor motility in an AhR-dependent manner [25]. AhR signaling is considered a vital component of the immune response at barrier sites. Thus, it is crucial for intestinal homeostasis by acting on epithelial renewal, barrier integrity, and many immune cell types, such as intra-epithelial lymphocytes, T helper (Th)17 cells, innate lymphoid cells, macrophage dendritic cells, and neutrophils [26]. Dietary molecules and xenobiotics directly activate AhR. Also, many AhR ligands are processed and inactivated by cytochrome p450 family proteins, such as cyp1a1, which is a direct AhR transcriptional target constituting a feedback loop for AhR signaling [27]. However, some metabolites such as 5-HT act indirectly on AhR through a CYP inhibiting mechanism, thereby expanding receptor ligands [28]. Interestingly, 5-hydroxy indole acetic acid (5-HIAA) is, unlike 5-HT, an AhR agonist [29].

Pharmacological Targeting of L-Trp Metabolism

L-Trp metabolism leads to the production of several essential molecules for host physiology. It is perturbed in many diseases, notably neurological, psychiatric, metabolic, infectious, intestinal diseases, and cancer cells, making it an ideal pharmacological target [5,12–18].

Enzymatic Modulation

Dioxygenases Inhibitors

While present in healthy tissues, an increase and constitutive IDO expression has been described in multiple cancers, contributing to immune suppression and neovascularization [30]. IDO1 inhibitors allow the restoration of immune cell function [1]. These inhibitors are currently being evaluated in Phase I or II clinical trials (indoximod, epacadostat, navoximod, EOS200271, and BMS-986205; Table 1). They are well-tolerated, but their effects as a monotherapy are insufficient. They are now evaluated in combination with immune checkpoint inhibitors. However, the results obtained are mixed [31,32]. A possible explanation for the failure of this combination may result from the induction of IL-4I1 by IDO1, allowing the immune escape of the tumor clone [25]. Under these circumstances, a tritherapy comprising an inhibitor of IDO1, a checkpoint inhibitor, and an inhibitor of IL-4I1 could be an interesting avenue. Research for new IDO1 inhibitors continues actively [25,33]. Beyond cancer, targeting of IDO1 could also concern patients with metabolic disorders since obesity is associated with an increase of IDO1 activity in the gut, which hijacks L-Trp to the KP at the production expense of indoles by the microbiota. Genetic or pharmacological inhibition of IDO1 improves insulin sensitivity, decreases endotoxemia, and regulates lipid metabolism [34]. Initially, TDO was thought to be only constitutively expressed in the liver. However, TDO was also shown to be expressed in various cancer cells, including breast cancer, ovarian carcinoma, and gliomas. It is involved in progression and immune suppression through the TDO-L-kyn-AhR pathway, and inhibition of TDO contributes to reverse immune escape [1,35,36]. Currently, TDO inhibitors are mainly in preclinical stages. However, research is moving toward dual IDO1 and TDO inhibitors since both are involved in the pathophysiology of cancer through the synthesis of the immunomodulatory metabolite L-kyn. Inhibitors targeting both enzymes include HTI-1090, DN14066131, RG70099, and EPL-1410. The oral inhibitor HTI-1090 (SHR9146) is being evaluated in a Phase I clinical trial alone or in combination with a programmed cell death protein 1 (PD-1) or vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) inhibitor for the treatment of solid tumors (NCT03208959 and NCT03491631; <https://www.clinicaltrials.gov/>).

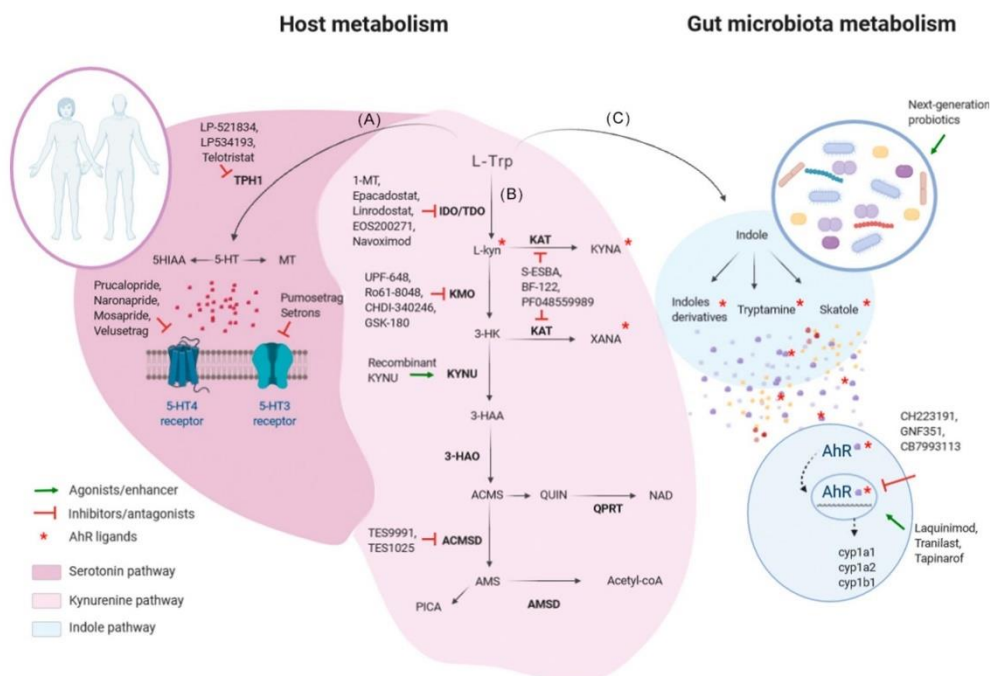
KAT Inhibitors

The impaired glutamatergic activity of the NMDA receptors is involved in schizophrenia, with a potential role for the NMDA antagonist KYNA. A meta-analysis of 13 studies showed an elevation

hepatic regeneration, intestinal motility, insulin secretion, erythropoiesis, adipocytes differentiation, immune responses, and the fibrosis process.

Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO): specific enzyme that catabolizes the same reaction as IDO at physiological level. Constitutively expressed on the liver, it is also involved in physiopathology of many cancers where it plays a role in immune escape. Pharmacological target in cancers.

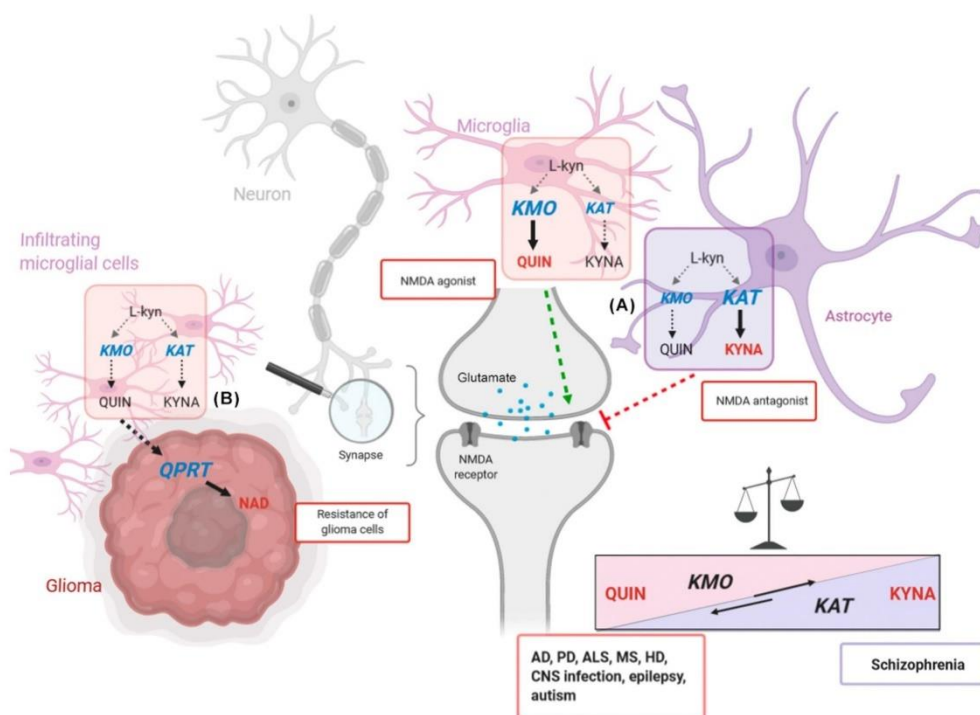
Tryptophan hydroxylase (TPH): 5-HT synthesis enzyme from L-Trp. Tph1 and Tph2 isoforms are responsible, respectively, for the synthesis of 5-HT in EOCs of the intestine, pancreatic β cells, fat cells, lung, pineal gland, CNS, and enteric nervous system neurons. Interesting pharmacological target for inhibiting pathophysiological mechanisms such as inflammation, angiogenesis, fibrosis, and cell proliferation. Pharmacological target in intestinal diseases associated with transit disorders.



Trends in Pharmacological Sciences

Figure 1. L-Trp Metabolism and Pharmacological Targets. Host L-Trp metabolism follows the 5-HT and the kynurenine pathways in which several pharmacological targets are currently under development. (A) L-Trp is metabolized to 5-HT which can either be degraded to 5-HIAA or metabolized to MT. Pharmacological targets are the rate-limiting enzyme in 5-HT synthesis TPH1 and the peripheral 5-HT receptors. (B) The L-kyn pathway involves a series of enzymatic reactions which constitute potential therapeutic targets. (C) Unabsorbed L-Trp is metabolized by intestinal microorganisms into several molecules, such as indole derivatives, tryptamine, and skatole, some of which are AhR ligands. After binding of its ligand in the cytosol, AhR translocates in the nucleus and binds to specific DNA sequences resulting in the transcription of target genes including those of the cytochrome p450 family. AhR could be targeted by antagonist or agonist molecules. Administration of next-generation probiotics could also modulate L-Trp metabolism. Abbreviations: 1-MT, 1-methyltryptophan; 3-HAA, 3-hydroxyanthranilic acid; 3-HAO, 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase; 3-HK, 3-hydroxykynurenine; 5-HIAA, 5-hydroxyindole acetic acid; 5-HT, serotonin; ACMS, 2-amino-3-carboxymuconic acid-6-semialdehyde; ACMSD, 2-amino-3-carboxymuconate-semialdehyde decarboxylase; AhR, aryl hydrocarbon receptor; AMSD, 2-aminomuconic semialdehyde dehydrogenase; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; KAT, kynurenine aminotransferase; KMO, kynurenine monooxygenase; KYNA, kynurenine acid; KYNU, kynureninase; L-kyn, L-kynurenine; L-Trp, L-tryptophan; MT, melatonin; NAD, nicotinamide; PICA, picolinic acid; QPRT, quinolinate phosphoribosyltransferase; QUIN, quinolinic acid; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; TPH1, tryptophan hydroxylase 1; XANA, xanthurenic acid.

of KYNA in the CSF and CNS of patients with schizophrenia. In rats, the cerebral level of KYNA has been positively correlated with cognitive deficits similar to the ones observed in schizophrenia [37–39] (Figure 2). In this context, KAT inhibitors showed promising effects on cognitive functions, likely through decreased production of KYNA [40]. Several KAT inhibitors, such as PF-04859989, BFF-122, and S-ESBA (Table 2), have been identified. PF-04859989 and BFF-122 act as KAT II inhibitors by irreversibly binding to the pyridoxal phosphate (PLP) cofactor [41,42]. This vitamin B6-derived coenzyme plays a role in a wide variety of enzymatic reactions. However, because over 300 PLP-dependent enzymes and proteins have been identified, irreversible binding to PLP may cause side effects. Such is the case with carbidopa that irreversibly binds to free PLP and PLP-dependent enzymes [43].

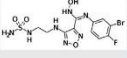
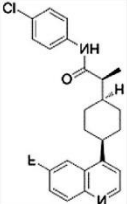
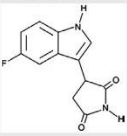
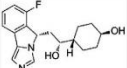


Trends in Pharmacological Sciences

Moreover, recently a central function for vitamin B6 and PLP in the homeostatic host–microbiota crosstalk through L-Trp metabolism has been shown [44]. It may be hazardous to exacerbate an imbalance in L-Trp metabolism in patients since dysregulation of host–microbiota homeostasis has shown its involvement in many diseases. S-ESBA has shown interesting effects in rats, but its inhibitory activity on the human enzyme is too weak to consider its clinical use [45]. Given potential toxicity or lack of efficacy, these molecules have not reached the threshold for clinical trials, and research has moved toward the development of inhibitors targeting the active site of the enzyme [46].

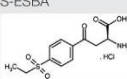
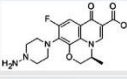
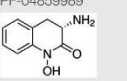
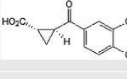
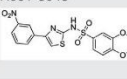
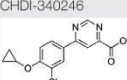
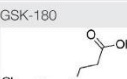
Finally, KAT inhibition by itself might be detrimental. In inflammatory bowel disease (IBD), the increased KAT activity is thought to be a compensatory mechanism for modulating inflammation and reducing cytotoxicity [47]. However, it should be noted that the elevation of KYNA observed in schizophrenia could be caused by an increase of peripheral L-kyn synthesis, making it more available for its passage through the blood–brain barrier (BBB) [38]. Also, the elevation of KYNA in patients with

Table 1. List of Currently Investigated IDO1 Inhibitors^a

Molecule	Structure and properties	Investigations	Published studies	Active or recruiting studies ^b
1-MT-L-Trp	Analog of L-Trp Nonspecific competitive inhibitor of IDO1 Increases the effectiveness of anticancer drugs and increases KYNA <i>in vivo</i> and <i>ex vivo</i> regardless of IDO	Fundamental research [83]	Advanced malignancies: well tolerated (monotherapy) [67]	Phase I/II: breast (NCT01042535, NCT01792050), pancreatic (NCT02077881), prostate (NCT01560923), non-small cell lung cancer (NCT02460367), solid (NCT00567931, NCT01191216), brain tumors (NCT04049669, NCT02052648, NCT02502708), leukemia (NCT02835729), and melanoma (NCT03301636, NCT02073123)
1-MT-D-Trp (indoximod)	Low <i>in vitro</i> activity but effective <i>in vivo</i> , preferentially inhibit IDO2 May promote tumor growth by off-target effect Prodrug: NLG802	Cancers (alone or in combination) [84,85]		
Epacadostat INCB024360 	Selective reversible competitive inhibitor of IDO1 Antitumoral (decreases Tregs, increases synthesis of IFN γ by T cells) but lack of activity as a monotherapy Metabolized by the intestinal microbiota and the enzyme UGT1A9 (AhR target)	Cancers (only in combination) [86,87]	Ovarian cancer: no benefit [88] Tumors: well tolerated and had encouraging antitumor activity [89] Metastatic melanoma: no benefit [31]	Phase I/II: thymic carcinoma (NCT02364076), naso-pharyngeal (NCT04231864), gastric (NCT03196232), gastrointestinal (NCT03291054), pancreatic (NCT03006302), urothelial bladder (NCT03832673), non-small cell lung (NCT03322566, NCT03322540), and rectal (NCT03516708) cancers, melanoma (NCT01961115), sarcoma (NCT03414229), metastatic solid tumors (NCT03347123) Phase III: urothelial (NCT03361865, NCT03374488) and renal carcinoma (NCT03260894), head and neck carcinoma (NCT03358472)
Linrodostat BMS-986205 	Potent, selective, and irreversible IDO1 inhibitor, restores T-cell proliferation and reduces intratumoral L-kyn up to 90%	Cancers [90–92]	Tumors: well tolerated ($\pm$ nivolumab), need further investigations for efficacy [91]	Phase I/II: pharmacokinetics (NCT03378310, NCT03312426) and safety (NCT03192943), Endometrial (NCT04106414), liver (NCT03695250), gastric (NCT02935634) head and neck (NCT03854032) and bladder (NCT03519256) cancers, solid tumors (NCT03792750, NCT03459222, NCT02658890) glioblastoma (NCT04047706) Phase III: bladder cancer (NCT03661320, NCT03661320), melanoma (NCT03329846)
EOS200271 	IDO1 specific non-competitive inhibitor Oral use Brain permeable	Glioma Association with PD-L1 inhibitors [93,94]	Malignant glioma: well tolerated [94]	
Navoximod, GDC-0919, or NLG-919 	Moderately selective noncompetitive reversible inhibitor Dose-dependent activation and proliferation of effector T cells, Regression of large established tumors Synergy with indoximod Increases survival ($\pm$ chemotherapy) currently optimized by prodrug formulation	Cancers [96]	Recurrent advances solid tumors: well tolerated and reduced plasmatic L-kyn [97]	Phase I/II: solid tumors (NCT02471846, NCT02048709)

^aAbbreviations: IFN, interferon; Treg, regulatory T cell.^bClinical trials can be accessed at <https://www.clinicaltrials.gov/>.

Table 2. List of Currently Investigated KAT and KMO Inhibitors

Molecule	Structure and properties	Investigations
KAT inhibitors		
S-ESBA 	L-kyn analog Selective competitive inhibitor of KAT II Decreases KYNA and increases dopamine in rat brain but has a very low activity against human KAT II Synergizes with QUIN in the induction of striatum lesions	Discontinued (weak human KAT inhibitor) [49,98]
BF-122 	Levofloxacin analog Potent human KAT II inhibitor Decreases KYNA without affecting QUIN and increases dopamine	Discontinued (pyridoxal phosphate binding) [49,98]
PF-04859989 	Selective and irreversible inhibitor Brain-penetrable Decreases KYNA in the prefrontal cortex (50%) Restores nicotine-induced glutamatergic activity Low oral bioavailability and rapid metabolism Lead compound for the synthesis of numerous derivatives	Discontinued (pyridoxal phosphate binding) [49,98]
KMO inhibitors		
UPF648 	L-kyn derivative Selective inhibitor Increases KYNA (dose-dependent), decreases QUIN and 3-HK synthesis Protects against QUIN-mediated toxicity	[49]
Ro61-8048 	L-kyn derivative Inhibits QUIN synthesis Increases KYNA Analgesic effect	Parkinson's, Alzheimer's, Huntington's Addiction treatment Multiple sclerosis, CNS infection [49,99]
CHDI-340246 	Chlorine derivative Low BBB pass Increases striatal and plasma L-kyn, KYNA Decreases plasma 3-HK	Huntington's [49,51,100]
GSK-180 	Oxazolidinone derivative Potent and specific but low cell penetration	Acute pancreatitis [101]

neurodegenerative disease remains controversial. Recently, an increase in KYNA has been shown in the CSF of patients with Alzheimer's disease [48]. This underlines the need to deepen our knowledge of the regulatory mechanisms of KP to provide more targeted therapeutic interventions. A more detailed review of the development of the KAT inhibitors is provided by Jacobs *et al.* [49].

KMO Inhibitors

KMO is located at a critical branching point in KP, leading to the synthesis of downstream metabolites 3-HK and QUIN. Given the deleterious effects of these two metabolites as observed in neurodegenerative diseases, epilepsy, autism, CNS infection (Figure 2), acute pancreatitis, pain, and certain cancers, KMO represents a key target in the treatment of these conditions. KMO is mainly expressed in microglia, where its inhibition induces a decrease of 3-HK and QUIN and shifts L-kyn metabolism toward the production of neuroprotective KYNA [50,51]. KMO inhibitors include halogenated L-kyn derivatives (UPF648, Ro61-8048), chlorine derivative (CHDI-340246), and

chlorinated benzisoxazole (GSK-180). However, all are still at the preclinical phase of development (Table 2). Peripheral KMO inhibition is sufficient to increase cerebral levels of KYNA via increasing L-kyn transport to the brain. However, KMO inhibitors that cross the BBB would be more attractive for treating neuropsychiatric conditions and are currently being developed [52]. Finally, diclofenac, a potent non-steroidal anti-inflammatory drug, was recently shown to exhibit a KMO inhibition effect, which can account for some of its efficacy [53–55].

KYNU Inhibitors

While cancers are characterized by upregulation of *IDO1*, dermatological diseases such as psoriasis or atopic dermatitis are associated with an increased expression of *KYNU*, which correlates with the severity of the disease and tends to decrease with anti-inflammatory treatments [56]. To date, no efficient *KYNU* inhibitors have been developed. The use of this type of molecule may be limited by the inhibitory role of *KYNU* on cancer cell proliferation [57].

QPRT Inhibitors

QPRT is involved in the *de novo* synthesis of NAD, an essential cofactor for many cellular functions, including oxidative phosphorylation, macrophage physiology, and global immune system homeostasis. This cofactor is crucial for the survival of glioma cells. The neoplastic transformation of normal astrocytes into glioma cells is associated with a QPRT-mediated switch in NAD metabolism. It exploits microglia-derived QUIN as an alternative source to replenish intracellular NAD pools [58]. Blocking QPRT seems attractive for glioma treatment, but it causes an accumulation of neurotoxic QUIN, which is linked to many neurological disorders such as Parkinson's, autism, epilepsy, Huntington disease, multiple sclerosis, Alzheimer's disease, and depression [7,8,59–61]. To date, the only known inhibitor of QPRT is phthalic acid, a QUIN analog acting as a moderately potent competitive inhibitor leading to increased urinary excretion of QUIN [62]. Moreover, as NAD is essential for global metabolic and immune homeostasis, QPRT inhibitors for cancer therapy could target malignant cells selectively.

ACMSD Inhibitors

By blocking the pathway leading to PICA and acetyl-CoA, ACMSD inhibitors such as phthalate esters shift the KP toward QUIN synthesis and downstream metabolite NAD. However, phthalate esters being endocrine disruptors are excluded from any therapeutic use. Thus, other molecules, such as TES-991 and TES-1025, have been developed [63,64]. The first proved to reduce hepatic steatosis, inflammation, and hepatic lipid accumulation in a murine model of non-alcoholic fatty liver disease. Simultaneously, the second had a protective effect in a mouse model of acute kidney injury [63]. It is important to emphasize that the synthesis of NAD requires the metabolism of QUIN by QPRT. This enzyme being easily saturable, the efflux of QUIN secondary to the inhibition of ACMSD could lead to the deleterious accumulation of this neurotoxic metabolite [8]. There is currently no attempt to inhibit ACMSD in humans pharmacologically and, NAD supplementation, which is much safer, is preferred.

Recombinant KYNUs

Beyond *IDO/TDO* inhibition, L-kyn depletion can rely on the use of recombinant *KYNU*. Because the human enzyme preferentially degrades 3-HK, research is directed toward bacterial *KYNUs*, which have a significant catalytic activity toward L-kyn. Bacterial polyethylene glycol (PEG)ylated *KYNUs* can deplete L-kyn produced by human cancer cells expressing *IDO1* and *TDO*. A single subcutaneous dose of *KYNU* can deplete L-kyn in both plasma and tumors and increase the intratumoral effector T-cells in mice [65]. *KYNU* combined with anti-PD-1 showed greater efficacy than epacadostat/anti-PD-1 combination in tumor-bearing mice and resulted in complete tumor eradication in 60% of the animals [66].

TPH Inhibitors

Besides its physiological functions, 5-HT is involved in cancer (including carcinoid syndrome), gastrointestinal disorders, thrombosis, inflammation, diabetes, obesity, pulmonary hypertension, and fibrosis. Inhibiting its production by targeting TPH is thus a strategy explored in these indications. Several TPH inhibitors have been developed (LP-521834, LP-534193, and telotristat), but only telotristat is currently used. This molecule is a non-brain-permeable TPH inhibitor recently approved by the FDA to treat diarrhea in carcinoid syndrome combined with a somatostatin analog [67]. It also reduces the severity of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice and increases the number of goblet cells that produce protective mucus in the colon [68].

Receptor Modulators

5-HT Receptors

5-HT₃ and 5-HT₄ receptors expressed in the intestine are the subjects of clinical investigations for the treatment of gastrointestinal disorders, notably irritable bowel syndrome (IBS). The 5-HT₃ receptor is expressed on excitatory cells, including afferent and efferent nerve fibers. It is the target for antagonists belonging to the class of 'setrons' useful for treating nausea and vomiting during chemotherapy. As one of their side effects is constipation, they have also been investigated in the treatment of predominantly diarrheal IBS. Conversely, the 5-HT₃ receptor could also be targeted with partial agonists such as pumosestrag for predominantly diarrheal IBS treatment to decrease receptor activation when the 5-HT concentration in the cellular environment is too high. The 5-HT₄ receptor is expressed on ECCs and enteric neurons. It facilitates the release of acetylcholine to relax colonic smooth muscles. This receptor is targeted by prokinetic agents used in the treatment of constipation associated or not with IBS, but the lack of selectivity of the first molecules, such as tegaserod or cisapride, has led to the development of more selective 5-HT₄ receptor agonists including prucalopride, naronapride, mosapride, and velusetrag, which have been marketed (except naronapride).

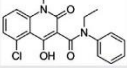
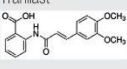
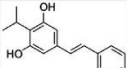
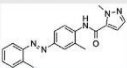
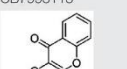
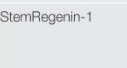
AhR

AhR is an attractive therapeutic target in autoimmune, cancerous, neurodegenerative, or intestinal disorders owing to its involvement in a wide variety of physiological and pathological processes. In oncology, AhR is involved in an immunotolerance loop that allows tumor escape and receptor antagonists, such as CH223191, CB7993113, and GNF351 (Table 3) have been used as antitumor agents. However, because of the pleiotropic effect of AhR, its inhibition could lead to deleterious consequences.

StemRegenin 1 (SR1) is a compound originally isolated from donor blood for its ability to increase the number of CD34+ cells for hematopoietic stem cell transplantation (HSC) [69,70]. Its *ex vivo* use makes it possible to overcome the pleiotropic effects of AhR antagonism, and the molecule is currently under clinical investigation for malignant hemopathies and neutropenia treatment. SR-1 is also named HSC-835 or MGTA-456.

Research on AhR mainly focuses on its anti-inflammatory potential via the use of agonist molecules such as tranilast, laquinimod, and tapinarof (Table 3). The former is already marketed for the treatment of bronchial asthma. It is currently undergoing Phase II (rheumatoid arthritis) and Phase III (hyperuricemia, pterygium) clinical trials. Beyond AhR activation, it has many other functions widely reviewed in [71]. Laquinimod is a KYNA-like molecule with a quinoline structure, currently under development for the treatment of multiple sclerosis, active lupus arthritis (NCT01085084), lupus nephritis (NCT01085097), and Huntington's disease (NCT02215616). It has shown positive results in a Phase III randomized controlled trial (RCT) in Crohn's disease [72], but the effects were mixed in multiple sclerosis. Tapinarof is in Phase III clinical trials for psoriasis treatment. Beyond conventional

Table 3. List of Currently Investigated AhR Agonists and Antagonists

Molecule	Structure and properties	Investigations	Published studies	Active or recruiting studies ^c
AhR agonists				
Laquinimod 	Quinoline 3-carboxamide structural similar to KYNA AhR-dependent effects on encephalomyelitis Mixed results (Phase II and III clinical trials – multiple sclerosis) Allows remyelination	Huntington's Multiple sclerosis Crohn's disease [102,103]	Multiple sclerosis: well tolerated, significant reduction in brain atrophy [104,105] Crohn's disease: well tolerated, promising effects [72]	Phase I/II: efficacy and safety in relapsing multiple sclerosis (NCT01047319), Huntington's disease (NCT02215616), lupus arthritis (NCT01085084), lupus nephritis (NCT01085097), Crohn's disease (NCT00737932), relapsing multiple sclerosis (NCT01975298)
Tranilast 	Synthetic analog of ANA	Asthma (marketed) Rheumatoid arthritis Multiple sclerosis Hyperuricemia Cancer [71]	Prostate cancer: benefit on prognosis [71]	Phase I/II: mucinosis (NCT03490708) scleroderma diabeticorum (NCT03512873) sarcoidosis (NCT03528070), cryopyrin-associated periodic syndrome (NCT03923140), pterygium (NCT01003613), hyperuricemia (NCT00995618, NCT01052987), gout (NCT01109121), rheumatoid arthritis (NCT00882024)
Tapinarof (benvitimod) 	Bacterial stilbene Free radical scavenger Dermal application	Psoriasis atopic dermatitis [106]	Psoriasis and atopic dermatitis: well tolerated [107,108]	Phase I/II: safety, tolerability, and pharmacokinetics of tapinarof cream, 1% (extensive plaque psoriasis) (NCT04042103) Phase III: efficacy and safety of topical tapinarof cream, 1% (plaque psoriasis) (NCT03956355)
AhR antagonists				
CH-223191 	Competitive selective antagonist No antagonistic activity with non-HAH ligands ^a	Fundamental research but may be a promising effect in pancreatic cancer [109]		No active clinical trials
CB7993113 	Good oral bioavailability Blocks tumor cell migration and reduces the invasive phenotype of ER-/PR-/HER2- ^b breast cancer cells <i>in vitro</i>	[70,95]		
StemRegenin-1 	Ex vivo application Expand CD34+ cells	Stem cell transplantation Neutropenia Thrombocytopenia	CD34+ cell expansion [69,70]	Malignant hemopathies (NCT01474681 and NCT01930162) Neutropenia and thrombocytopenia (NCT03406962)

^aNon-HAH ligands (halogenated aromatic hydrocarbons) include polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as well as endogenous L-Trp ligands. HAHs are distinguished from PAHs and endogenous ligands by very slow metabolism and a prolonged effect on the AhR receptor.

^bAbbreviations: ER, estrogen receptor; HER, human epidermal growth factor receptor 2; PR, progesterone receptor.

^cClinical trials can be accessed at <https://www.clinicaltrials.gov/>.

agonists and antagonists, the new concept of selective AhR modulators (SAhRMs) designates any AhR ligand that lacks agonist activity but can repress the expression of acute inflammatory phase genes. These molecules are reviewed in [73].

Administration of KYNA and its Derivatives

To date, neuroprotective KYNA is the only KP metabolite directly used for therapeutic purposes. It is well-tolerated by the dermal route and could be used in the prevention of scars. It does not cross the skin barrier, thus avoiding systemic effects [74]. Owing to its short half-life and reduced

brain permeability, chlorinated analogs crossing the BBB have been synthesized, such as 4-chloro-kynurenine. This KYNA prodrug has an anti-epileptogenic effect by reducing seizure duration, hippocampal lesions, and has an antidepressant effect [75]. KAT metabolizes it to 7-chloro-kynurenic acid, an NMDA receptor inhibitor. Despite encouraging results *in vivo* and good tolerance in humans, a Phase II RCT (NCT02484456) did not affect the treatment of depression [76–78]. The AhR agonist laquinimod, mentioned earlier, is also a derivative of KYNA. At present, no other metabolite of KP has been investigated.

Beyond KP, several molecules derived from the bacterial metabolism of L-Trp have shown promising effects *in vivo* on colitis and metabolic syndrome through their agonist effect on AhR [21,24,79]. Thus, the administration of live microbes able to metabolize L-Trp into therapeutic indole derivatives could also be envisaged.

Next-Generation Probiotics

With the rapid improvement of knowledge on intestinal microbiota, a significant effort to identify and characterize new microbial strains with therapeutic potential isolated from the intestine (live biotherapeutic products) has been carried out to target mechanisms of action and diseases [80]. For example, the administration of *Lactobacillus*, which naturally produces AhR agonists, improves colitis severity in mice and dietary-induced metabolic impairments, suggesting therapeutic interventions for IBD [24] and metabolic disorders [79]. Next-generation **probiotics** have been mostly identified based on comparative analysis of microbiota compositions between healthy and unhealthy individuals [81]. They also include recombinant microorganisms over-expressing genes of interest and could represent an excellent alternative approach to modulate host physiology. Genes of interest could be human genes with therapeutic potential or bacterial genes involved in the synthesis of indole derivatives. The main obstacles to developing next-generation probiotics are the lack of a clearly defined regulatory pathway and the manufacturing, as many of these microorganisms require highly demanding conditions to grow [82]. However, probiotics may allow local delivery of desired metabolites and modulate other beneficial signaling pathways in the host.

Concluding Remarks

While the immunomodulatory role of metabolites such as L-kyn and KYNA seems protective, a deleterious function is attributed to them in cancer and schizophrenia, respectively. In addition, QUIN and 3-HK are involved in neurodegenerative diseases. The former is also the precursor of the essential cofactor NAD. This same duality is found for AhR since the therapeutic strategy differs according to the disease reserving the agonists for inflammatory diseases and the antagonists for targeting cancer. Targeting 5-HT receptors can also have dual effects, depending on the context. The metabolism of L-Trp is thus a promising therapeutic target. However, it requires in-depth knowledge of the regulatory mechanisms and their interconnections to define the appropriate intervention for each supposed indication, and to have the ability to precisely act on the targeted metabolite or enzyme (see [Outstanding Questions](#)).

Besides the multiple molecules currently under clinical investigation, next-generation probiotics carrying the appropriate enzymatic machinery for the synthesis of indoles are also in development. They offer numerous possibilities for modulation of the pleiotropic receptor AhR.

Acknowledgments

Harry Sokol received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program (ERC-2016-STG-71577). The Peer-Reviewed Medical Research Program also supported this work – Investigator-Initiated Research Award under Award No. W81XWH-17-1-0479; National Institutes of Health (NIH) grants (ES030197; CA 222469).

Outstanding Questions

What are the consequences of blocking one L-Trp metabolism pathway on the others (undesirable effects, disease development)?

How do you selectively target a specific enzyme or metabolite in cells of interest?

What are the effects of indole derivatives produced by bacteria on KP and on the 5-HT production pathway?

What are the interconnections between the three major pathways of L-Trp metabolism?

What are the precise regulatory mechanisms of KP?

What would be the implications of development of kynureninase inhibitors?

How do you leverage gut microbiota to modulate L-Trp metabolism in a therapeutic perspective?

Disclaimer Statement

H.S. received unrestricted study grants from Danone, Biocodex, and Enterome; board membership, consultancy, or lecture fees from Carenity, Abbvie, Astellas, Danone, Ferring, Mayoly Spindler, MSD, Novartis, Roche, Tillots, Enterome, Maat, BiomX, Biore, Novartis, and Takeda; and is a co-founder of Exellom bioscience.

References

- Lemos, H. *et al.* (2019) Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 19, 162–175
- Liu, Y. *et al.* (2018) Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8⁺ T cells by transferring kynurenine and AHR activation. *Cancer Cell* 33, 480–494.e7
- Badawy, A.A.-B. (2017) Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: regulatory and functional aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* 10 1178646917691938
- Lim, C.K. *et al.* (2017) Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 155, 76–95
- Fujigaki, H. *et al.* (2017) L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: focus on cell type differences. *Neuropharmacology* 112, 264–274
- Fania, L. *et al.* (2019) Role of nicotinamide in genomic stability and skin cancer chemoprevention. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5946
- Lim, C.K. *et al.* (2016) Altered kynurenine pathway metabolism in autism: implication for immune-induced glutamatergic activity. *Autism Res.* 9, 621–631
- Brundin, L. *et al.* (2016) An enzyme in the kynurenine pathway that governs vulnerability to suicidal behavior by regulating excitotoxicity and neuroinflammation. *Transl. Psychiatry* 6, e865
- Fukuwatari, T. (2020) Possibility of amino acid treatment to prevent the psychiatric disorders via modulation of the production of tryptophan metabolite kynurenine acid. *Nutrients* 12, 1403
- Agudelo, L.Z. *et al.* (2018) Kynurenine acid and Gpr35 regulate adipose tissue energy homeostasis and inflammation. *Cell Metab.* 27, 378–392.e5
- Wang, G. *et al.* (2018) Kynurenine acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 25, 1209–1223
- Stone, T.W. (2020) Does kynurenine acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *J. Neurochem.* 152, 627–649
- Fazio, F. *et al.* (2015) Xanthurenic acid activates mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors and is a potential trait marker for schizophrenia. *Sci. Rep.* 5, 17799
- Agus, A. *et al.* (2018) Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe* 23, 716–724
- Reigstad, C.S. *et al.* (2015) Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J.* 29, 1395–1403
- Yano, J.M. *et al.* (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161, 264–276
- Esteban-Zubero, E. *et al.* (2017) Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: a review. *Life Sci.* 170, 72–81
- Jennis, M. *et al.* (2017) Microbiota-derived tryptophan indoles increase after gastric bypass surgery and reduce intestinal permeability in vitro and in vivo. *Neurogastroenterol. Motil.* 30, e13178
- Konopelski, P. *et al.* (2019) Indole-3-propionic acid, a tryptophan-derived bacterial metabolite, reduces weight gain in rats. *Nutrients* 11, 591
- Kurata, K. *et al.* (2019) Skatole regulates intestinal epithelial cellular functions through activating aryl hydrocarbon receptors and p38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 510, 649–655
- Wlodarska, M. *et al.* (2017) Indoleacrylic acid produced by commensal *Peptostreptococcus* species suppresses inflammation. *Cell Host Microbe* 22, 25–37.e6
- Galligan, J.J. (2018) Beneficial actions of microbiota-derived tryptophan metabolites. *Neurogastroenterol. Motil.* 30, e13283
- Bhattarai, Y. *et al.* (2018) Gut microbiota-produced tryptamine activates an epithelial G-protein-coupled receptor to increase colonic secretion. *Cell Host Microbe* 23, 775–785.e5
- Lamas, B. *et al.* (2016) CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* 22, 598–605
- Sadik, A. *et al.* (2020) IL4I1 is a metabolic immune checkpoint that activates the AHR and promotes tumor progression. *Cell* 182, 1252–1270.e34
- Lamas, B. *et al.* (2018) Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol.* 11, 1024–1038
- Schiering, C. *et al.* (2017) Feedback control of AHR signaling regulates intestinal immunity. *Nature* 542, 242–245
- Manzella, C.R. *et al.* (2020) Serotonin modulates AHR activation by interfering with CYP1A1-mediated clearance of AHR ligands. *Cell. Physiol. Biochem.* 54, 126–141
- Rosser, E.C. *et al.* (2020) Microbiota-derived metabolites suppress arthritis by amplifying aryl-hydrocarbon receptor activation in regulatory B cells. *Cell Metab.* 31, 837–851.e10
- Uytendhoe, C. *et al.* (2003) Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9, 1269–1274
- Long, G.V. *et al.* (2019) Epacadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol.* 20, 1083–1097
- Daud, A. *et al.* (2018) Epacadostat plus nivolumab for advanced melanoma: updated phase 2 results of the ECHO-204 study. *J. Clin. Oncol.* 36, 9511
- Serafini, M. *et al.* (2020) Discovery of highly potent benzimidazole derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) inhibitors: from structure-based virtual screening to in vivo pharmacodynamic activity. *J. Med. Chem.* 63, 3047–3065
- Laurans, L. *et al.* (2018) Genetic deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes gut microbiota-mediated metabolic health. *Nat. Med.* 24, 1113–1120
- Opitz, C.A. *et al.* (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203
- Piotte, L. *et al.* (2012) Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2497–2502
- Kozak, R. *et al.* (2014) Reduction of brain kynurenine acid improves cognitive function. *J. Neurosci.* 34, 10592–10602
- Pittman, E. *et al.* (2017) Kynurenine acid in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr. Bull.* 43, 764–777
- Pociavsek, A. *et al.* (2019) Inhibition of kynurenine aminotransferase II attenuates hippocampus-dependent memory deficit in adult rats treated prenatally with kynurenine. *Hippocampus* 29, 73–77
- Kindler, J. *et al.* (2020) Dysregulation of kynurenine metabolism is related to proinflammatory cytokines, attention, and prefrontal cortex volume in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 25, 2860–2872
- Dounay, A.B. *et al.* (2012) Discovery of brain-penetrant, irreversible kynurenine aminotransferase II inhibitors for schizophrenia. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 187–192
- Rossi, F. *et al.* (2010) Crystal structure-based selective targeting of the pyridoxal 5'-phosphate dependent enzyme kynurenine aminotransferase II for cognitive enhancement. *J. Med. Chem.* 53, 5684–5689
- Hinz, M. *et al.* (2014) The Parkinson's disease death rate: carbidopa and vitamin B6. *Clin. Pharmacol.* 6, 161–169
- Cellini, B. *et al.* (2020) Pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes at the crossroads of host-microbe tryptophan metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5823
- Pellicciari, R. *et al.* (2008) Sequence variants in kynurenine aminotransferase II (KAT II) orthologs determine different potencies of the inhibitor S-ESBA. *ChemMedChem* 3, 1199–1202
- Yoshida, Y. *et al.* (2019) Selective and competitive inhibition of kynurenine aminotransferase 2 by glycyrrhizic acid and its analogues. *Sci. Rep.* 9, 10243

47. Dudzińska, E. *et al.* (2019) Increased expression of kynurenine aminotransferases mRNA in lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 12, 1756284819881304
48. González-Sánchez, M. *et al.* (2020) Kynurenic acid levels are increased in the CSF of Alzheimer's disease patients. *Biomolecules* 10, 571
49. Jacobs, K.R. *et al.* (2017) Major developments in the design of inhibitors along the kynurenine pathway. *Curr. Med. Chem.* 24, 2471–2495
50. Garrison, A.M. *et al.* (2018) Kynurenine pathway metabolic balance influences microglia activity: Targeting kynurenine monooxygenase to dampen neuroinflammation. *Psychoneuroendocrinology* 94, 1–10
51. Toledo-Sherman, L.M. *et al.* (2015) Development of a series of aryl pyrimidine kynurenine monooxygenase inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of Huntington's disease. *J. Med. Chem.* 58, 1159–1183
52. Zhang, S. *et al.* (2019) A brain-permeable inhibitor of the neurodegenerative disease target kynurenine 3-monooxygenase prevents accumulation of neurotoxic metabolites. *Commun. Biol.* 2, 271 Published online July 24, 2019. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0520-5>
53. Hutchinson, J.P. *et al.* (2017) Structural and mechanistic basis of differentiated inhibitors of the acute pancreatitis target kynurenine-3-monooxygenase. *Nat. Commun.* 8, 15827
54. Phillips, R.S. *et al.* (2017) Substrate and inhibitor specificity of kynurenine monooxygenase from *Cytophaga hutchinsonii*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 1705–1708
55. Shave, S. *et al.* (2018) Diclofenac Identified as a kynurenine 3-monooxygenase binder and inhibitor by molecular similarity techniques. *ACS Omega* 3, 2564–2568
56. Harden, J.L. *et al.* (2016) The tryptophan metabolism enzyme L-kynureninase is a novel inflammatory factor in psoriasis and other inflammatory diseases. *Allergy Clin. Immunol.* 137, 1830–1840
57. Liu, Y. *et al.* (2019) A novel role of kynureninase in the growth control of breast cancer cells and its relationships with breast cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 23, 6700–6707
58. Sahm, F. *et al.* (2013) The endogenous tryptophan metabolite and NAD⁺ precursor quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress. *Cancer Res.* 73, 3225–3234
59. Chang, K.-H. *et al.* (2018) Alterations of metabolic profile and kynurenine metabolism in the plasma of Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 6319–6328
60. Lim, C.K. *et al.* (2017) Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci. Rep.* 7, 1–9
61. Savitz, J. *et al.* (2015) Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder. *Brain Behav. Immun.* 46, 55–59
62. Nassan, F.L. *et al.* (2019) High phthalate exposure increased urinary concentrations of quinolinic acid, implicated in the pathogenesis of neurological disorders: is this a potential missing link? *Environ. Res.* 172, 430–436
63. Katsyuba, E. *et al.* (2018) De novo NAD⁺ synthesis enhances mitochondrial function and improves health. *Nature* 563, 354–359
64. Pellicciari, R. *et al.* (2018) α -Amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD) inhibitors as novel modulators of de novo nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) biosynthesis. *J. Med. Chem.* 61, 745–759
65. Zhang, M. *et al.* (2017) A novel approach to targeting the IDO/TDO pathway through degradation of the immunosuppressive metabolite kynurenine. *Cancer Res.* 77, 5570
66. Stone, E. *et al.* (2015) Depletion of kynurenine using an engineered therapeutic enzyme potentially inhibits cancer immune checkpoints both as a monotherapy and in combination with anti-PD-1. *Cancer Res.* 75, LB-226
67. Masab, M. and Saif, M.W. (2017) Telotristat ethyl: proof of principle and the first oral agent in the management of well-differentiated metastatic neuroendocrine tumor and carcinoid syndrome diarrhea. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 80, 1055–1062
68. Kim, J.J. *et al.* (2015) Blocking peripheral serotonin synthesis by telotristat etiprate (LX1032/LX1606) reduces severity of both chemical- and infection-induced intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G455–G465
69. Bolitano, A.E. *et al.* (2010) Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329, 1345–1348
70. Parks, A.J. *et al.* (2014) In silico identification of an aryl hydrocarbon receptor antagonist with biological activity in vitro and in vivo. *Mol. Pharmacol.* 86, 593–608
71. Darakhshan, S. and Pour, A.B. (2015) Tranilast: a review of its therapeutic applications. *Pharmacol. Res.* 91, 15–28
72. D'Haens, G. *et al.* (2015) A phase II study of laquinimod in Crohn's disease. *Gut* 64, 1227–1235
73. Dolci, D. *et al.* (2020) Targeting aryl hydrocarbon receptor for next-generation immunotherapies: selective modulators (SAhRMs) versus rapidly metabolized ligands (RMAhRLs). *Eur. J. Med. Chem.* 185, 111842
74. Papp, A. *et al.* (2018) The safety and tolerability of topically delivered kynurenic acid in humans: a phase 1 randomized double-blind clinical trial. *J. Pharm. Sci.* 107, 1572–1576
75. Sharma, M. *et al.* (2015) Role of the kynurenine pathway in epilepsy. In *Targeting the Broadly Pathogenic Kynurenine Pathway* (Mittal, S., ed.), pp. 205–213, Springer
76. Zanos, P. *et al.* (2015) The prodrug 4-chlorokynurenine causes ketamine-like antidepressant effects, but not side effects, by NMDA/GlycineB-site inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 355, 76–85
77. Wallace, M. *et al.* (2017) Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study: investigation of the safety, pharmacokinetics, and antihyperalgesic activity of 1-4-chlorokynurenine in healthy volunteers. *Scand. J. Pain* 17, 243–251
78. Park, L.T. *et al.* (2020) A randomized trial of the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site antagonist prodrug 4-chlorokynurenine in treatment-resistant depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 23, 417–425
79. Natividad, J.M. *et al.* (2018) Impaired aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is a key factor in metabolic syndrome. *Cell Metab.* 28, 739–749
80. Chang, C.-J. *et al.* (2019) Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* 27, 615–622
81. Martin, R. and Langella, P. (2019) Emerging health concepts in the probiotics field: streamlining the definitions. *Front. Microbiol.* 10, 1047
82. O'Toole, P.W. *et al.* (2017) Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol.* 2, 17057
83. Wirthgen, E. *et al.* (2020) The immunomodulator 1-methyltryptophan drives tryptophan catabolism toward the kynurenic acid branch. *Front. Immunol.* 11, 313
84. Soliman, H.H. *et al.* (2016) A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. *Oncotarget* 7, 22928–22938
85. Kumar, S. *et al.* (2020) Discovery of indoximod prodrugs and characterization of clinical candidate NLG802. *Eur. J. Med. Chem.* 198, 112373
86. Boer, J. *et al.* (2016) Roles of UGT, P450, and gut microbiota in the metabolism of epacadostat in humans. *Drug Metab. Dispos.* 44, 1668–1674
87. Lewis-Ballester, A. *et al.* (2017) Structural insights into substrate and inhibitor binding sites in human indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Nat. Commun.* 8, 1639
88. Kristeleit, R. *et al.* (2017) A randomised, open-label, phase 2 study of the IDO1 inhibitor epacadostat (INC024360) versus tamoxifen as therapy for biochemically recurrent (CA-125 relapse)-only epithelial ovarian cancer, primary peritoneal carcinoma, or fallopian tube cancer. *Gynecol. Oncol.* 146, 484–490
89. Mitchell, T.C. *et al.* (2018) Epacadostat plus pembrolizumab in patients with advanced solid tumors: phase I results from a multicenter, open-label phase I/II trial (ECHO-202/KEYNOTE-037). *J. Clin. Oncol.* 36, 3223–3230
90. Hunt, J.T. *et al.* (2017) Abstract 4964: Structure, in vitro biology and in vivo pharmacodynamic characterization of a novel clinical IDO1 inhibitor. *Cancer Res.* 77, 4964
91. Luke, J.J. *et al.* (2019) BMS-986205, an indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 inhibitor (IDO1), in combination with nivolumab

- (nivo); updated safety across all tumor cohorts and efficacy in advanced bladder cancer (advBC). *J. Clin. Oncol.* 37, 358
92. Siu, L.L. *et al.* (2017) Abstract CT116: BMS-986205, an optimized indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor, is well tolerated with potent pharmacodynamic (PD) activity, alone and in combination with nivolumab (nivo) in advanced cancers in a phase 1/2a trial. *Cancer Res.* 77, CT116
 93. Crosignani, S. *et al.* (2017) Discovery of a novel and selective indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO-1) inhibitor 3-(5-Fluoro-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (EOS200271/PF-06840003) and its characterization as a potential clinical candidate. *J. Med. Chem.* 60, 9617–9629
 94. Reardon, D.A. *et al.* (2020) A phase 1 study of PF-06840003, an oral indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor in patients with recurrent malignant glioma. *Invest. New Drugs* 38, 1784–1795
 95. Cheong, J.E. and Sun, L. (2018) Targeting the IDO1/TDO2–KYN–AhR pathway for cancer immunotherapy – challenges and opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 307–325
 96. Sun, J. *et al.* (2017) Programmable co-delivery of the immune checkpoint inhibitor NLG919 and chemotherapeutic doxorubicin via a redox-responsive immunostimulatory polymeric prodrug carrier. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 823–834
 97. Nayak-Kapoor, A. *et al.* (2018) Phase Ia study of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor navoximod (GDC-0919) in patients with recurrent advanced solid tumors. *J. Immunother. Cancer* 6, 61
 98. Platten, M. *et al.* (2019) Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 379
 99. Rojewski, E. *et al.* (2016) Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. *Neuropharmacology* 102, 80–91
 100. Beaumont, V. *et al.* (2016) The novel KMO inhibitor CHDI-340246 leads to a restoration of electrophysiological alterations in mouse models of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 282, 99–118
 101. Mole, D.J. *et al.* (2016) Kynurenine-3-monooxygenase inhibition prevents multiple organ failure in rodent models of acute pancreatitis. *Nat. Med.* 22, 202–209
 102. Kaye, J. *et al.* (2016) Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6145–E6152
 103. Nyamoya, S. *et al.* (2019) Laquinimod supports remyelination in non-supportive environments. *Cells* 8, 1363
 104. Ziemssen, T. *et al.* (2017) Safety and in vivo immune assessment of escalating doses of oral laquinimod in patients with RRMS. *J. Neuroinflammation* 14, 172
 105. Vollmer, T.L. *et al.* (2014) A randomized placebo-controlled phase III trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *J. Neurol.* 261, 773–783
 106. Smith, S.H. *et al.* (2017) Tapinarof is a natural AhR agonist that resolves skin inflammation in mice and humans. *J. Invest. Dermatol.* 137, 2110–2119
 107. Robbins, K. *et al.* (2019) Phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of plaque psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 80, 714–721
 108. Peppers, J. *et al.* (2019) A phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 80, 89–98.e3
 109. Leja-Szpak, A. *et al.* (2019) The opposite effect of L-kynurenine and AhR inhibitor Ch223191 on apoptotic protein expression in pancreatic carcinoma cells (Panc-1). *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 19, 2079–2090

Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome

Authors: Jane M Natividad¹, Allison Agus¹, Julien Planchais¹, Bruno Lamas², Anne Charlotte Jarry³, Rebeca Martin¹, Marie-Laure Michel¹, Caroline Chong-Nguyen³, Ronan Roussel⁴, Marjolene Straube⁵, Sarah Jegou⁵, Claire McQuitty⁵, Maude Le Gall³, Gregory da Costa¹, Emmanuelle Lecornet⁶, Chloé Michaudel¹, Morgane Modoux², Jeremy Glodt¹, Chantal Bridonneau¹, Bruno Sovran¹, Louise Dupraz², Andre Bado³, Mathias L Richard¹, Philippe Langella¹, Boris Hansel⁴, Jean-Marie Launay⁷, Ramnik J Xavier⁸, Henri Duboc³, Harry Sokol⁹

¹ Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France.

² Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France; Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, APHP Laboratoire des Biomolécules (LBM), 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France.

³ Inserm UMR 1149, UFR de Médecine Paris Diderot, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, DHU Unity APHP, 75890 Paris, France.

⁴ Department of Endocrinology, Diabetology, and Nutrition, HUPNVS, AP-HP, Paris Diderot University - Sorbonne Paris Cité, Paris, France; INSERM, U-1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France.

⁵ Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, APHP Laboratoire des Biomolécules (LBM), 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France.

⁶ Department of Diabetology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France.

⁷ INSERM, UMR S942, Department of Biochemistry, Lariboisière Hospital, Paris, France.

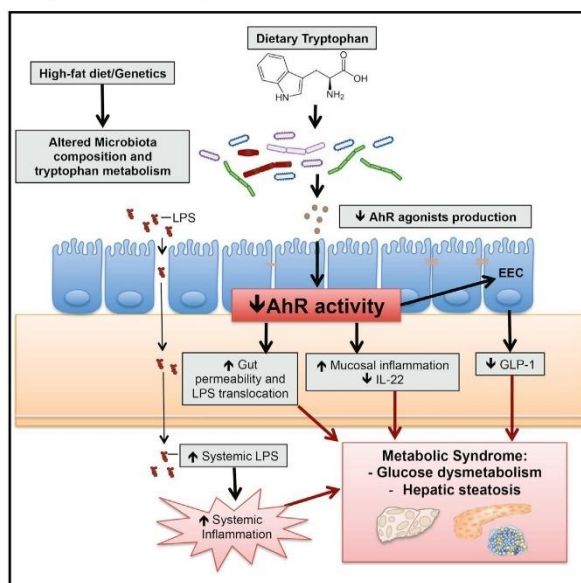
⁸ Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology (MIT) and Harvard University, Cambridge, MA, USA; Center for Computational and Integrative Biology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA; Gastrointestinal Unit and Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA; Center for Microbiome Informatics and Therapeutics, MIT, Cambridge, MA, USA.

⁹ Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France; Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, APHP Laboratoire des Biomolécules (LBM), 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France; Department of Gastroenterology, Saint Antoine Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, UPMC, Paris, France. Electronic address: harry.sokol@aphp.fr.

Cell Metabolism

Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome

Graphical Abstract



Authors

Jane M. Natividad, Allison Agus, Julien Planchais, ..., Ramnik J. Xavier, Henri Duboc, Harry Sokol

Correspondence

harry.sokol@aphp.fr

In Brief

Natividad et al. show that metabolic syndrome is associated with an impaired capacity of the gut microbiota to metabolize tryptophan into aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists in mice and humans. Supplementation with AhR agonist or a *Lactobacillus* strain naturally producing AhR ligands improves both dietary- and genetic-induced metabolic impairments.

Highlights

- Production of AhR agonists by the gut microbiota is reduced in metabolic syndrome
- Restoring AhR signaling induces beneficial effects on metabolic syndrome
- Restoration of the gut barrier defect and secretion of GLP-1 are involved



Natividad et al., 2018, Cell Metabolism 28, 737–749
November 6, 2018 © 2018 Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.001>

CellPress

Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome

Jane M. Natividad,^{1,13} Allison Agus,^{1,13} Julien Planchais,¹ Bruno Lamas,^{1,2} Anne Charlotte Jarry,³ Rebeca Martin,¹ Marie-Laure Michel,¹ Caroline Chong-Nguyen,³ Ronan Roussel,^{4,5} Marjolene Straube,² Sarah Jegou,² Claire McQuitty,² Maude Le Gall,³ Gregory da Costa,¹ Emmanuelle Lecornet,⁶ Chloé Michaudel,¹ Morgane Modoux,^{1,2} Jeremy Glodt,¹ Chantal Bridonneau,¹ Bruno Sovran,¹ Louise Dupraz,^{1,2} Andre Bado,³ Mathias L. Richard,¹ Philippe Langella,¹ Boris Hansel,^{4,5} Jean-Marie Launay,⁷ Ramnik J. Xavier,^{8,9,10,11} Henri Duboc,³ and Harry Sokol^{1,2,12,14,*}

¹Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 Jouy-en-Josas, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, École Normale Supérieure, CNRS, INSERM, APHP Laboratoire des Biomolécules (LBM), 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France

³INSERM UMR 1149, UFR de Médecine Paris Diderot, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, DHU Unity APHP, 75890 Paris, France

⁴Department of Endocrinology, Diabetology, and Nutrition, HUPNVS, AP-HP, Paris Diderot University – Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁵INSERM, U-1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

⁶Department of Diabetology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France

⁷INSERM, UMR S942, Department of Biochemistry, Lariboisière Hospital, Paris, France

⁸Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology (MIT) and Harvard University, Cambridge, MA, USA

⁹Center for Computational and Integrative Biology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

¹⁰Gastrointestinal Unit and Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

¹¹Center for Microbiome Informatics and Therapeutics, MIT, Cambridge, MA, USA

¹²Department of Gastroenterology, Saint Antoine Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, UPMC, Paris, France

¹³These authors contributed equally

¹⁴Lead Contact

*Correspondence: henry.sokol@aphp.fr

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.001>

SUMMARY

The extent to which microbiota alterations define or influence the outcome of metabolic diseases is still unclear, but the byproducts of microbiota metabolism are known to have an important role in mediating the host-microbiota interaction. Here, we identify that in both pre-clinical and clinical settings, metabolic syndrome is associated with the reduced capacity of the microbiota to metabolize tryptophan into derivatives that are able to activate the aryl hydrocarbon receptor. This alteration is not merely an effect of the disease as supplementation with AhR agonist or a *Lactobacillus* strain, with a high AhR ligand-production capacity, leads to improvement of both dietary- and genetic-induced metabolic impairments, particularly glucose dysmetabolism and liver steatosis, through improvement of intestinal barrier function and secretion of the incretin hormone GLP-1. These results highlight the role of gut microbiota-derived metabolites as a biomarker and as a basis for novel preventative or therapeutic interventions for metabolic disorders.



INTRODUCTION

The mammalian gastrointestinal tract is a natural bioreactor for diverse and highly mutualistic microorganisms, collectively referred to as the gut microbiota. Disruptions of the microbiota composition and function, which are caused by factors such as genetics and lifestyle choices, have been suggested to be critical contributing factors to the growth of the worldwide epidemics of chronic illness, including inflammatory and metabolic diseases (Ley et al., 2005, 2006; Ridaura et al., 2013; Turnbaugh et al., 2006). The molecular mechanisms that govern the pathogenic role of the microbiota, especially in metabolic syndrome, however, remain elusive.

The gut microbiota continually produces extremely diverse repertoire of metabolites from fermentation of both exogenous, such as dietary components, and endogenous sources (Blacher et al., 2017). These metabolites serve as important signals that contribute to the proper regulation of the host physiology and maintenance of health (Schirmer et al., 2016). As such, a need to define and characterize different microbiota-derived metabolites to complement gut microbiota compositional and functional characterization is beneficial not only to mechanistically understand the host-microbiota crosstalk but to also identify possible biomarkers or signatures for health and disease.

A group of microbiota metabolites, such as those produced through metabolism of tryptophan from dietary sources, has

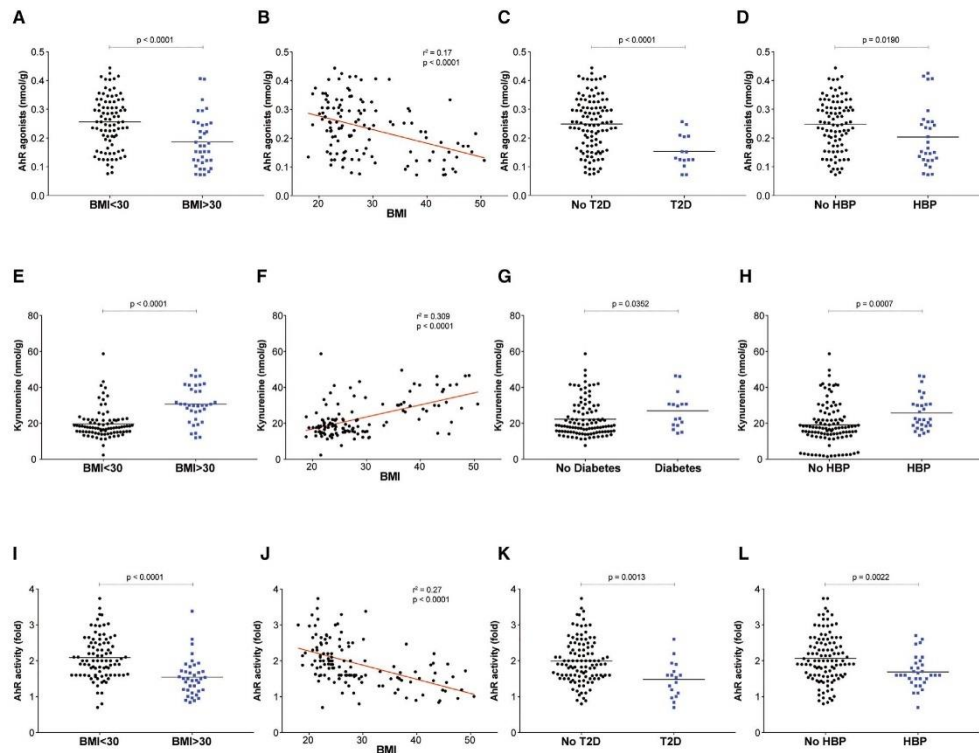


Figure 1. The Microbiota of Individuals with Metabolic Syndrome Show Decreased AhR Activation and Lower AhR Agonist Concentrations
 (A) Total concentrations of four AhR agonists (IAA, indole, 3-methylindole, and tryptamine) from feces of individuals with low and high BMIs.
 (B) Spearman correlation of the stool AhR agonist concentration and BMI.
 (C and D) AhR agonist concentrations of the feces according to T2D (C) and high blood pressure (HBP) (D) status.
 (E) Kynurenine concentrations of the feces from individuals with low and high BMIs.
 (F) Spearman correlation of the stool kynurenine concentration and BMI.
 (G and H) Kynurenine concentrations of the feces according to T2D (G) and HBP (H) status.
 (I) Quantification of the fecal AhR activity of individuals with low and high BMIs.
 (J) Spearman correlation of stool AhR activation and BMI.
 (K and L) Quantification of the fecal AhR activity according to T2D (K) and HBP (L) status. For AhR reporter assay, data were available in the whole population (n = 127). For AhR agonist dosage, results were not available in 4 patients (3 with BMI > 30 and 1 with BMI < 30).
 For all data, statistical comparisons were carried out by normality testing using Kolmogorov-Smirnov tests and subsequent ANOVAs or Kruskal-Wallis tests with Bonferroni or Dunn's post hoc tests.

been shown to signal through the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Zelante et al., 2013). AhR activation leads to several cellular responses and pathways including hormone and immune responses (Furue et al., 2014; Hao and Whitelaw, 2013; Leavy, 2011; Murray et al., 2014; Lamas et al., 2018), and thus can greatly influence health and disease risks. Indeed, we recently showed that the inefficiency of gut microbiota to produce tryptophan-based AhR ligands is involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, notably through impairment of interleukin (IL)-22 production (Lamas et al., 2016). Defective intestinal production of IL-22 has similarly been observed in

mice fed a high-fat diet (HFD) (Wang et al., 2014), but whether impaired microbiota-derived AhR ligands contribute to metabolic disorders has not yet been fully explored.

Independently of the gut microbiota, several studies have already investigated the possible role of AhR in metabolic syndrome by comparing the evolution of diet-induced metabolic impairments in *AhR*^{-/-} to *AhR*^{+/-} mice. Possibly due to growth retardation observed in *AhR*^{-/-} mice and phenotype variability between *AhR*^{-/-} strains (Esser, 2009), the results have been contradictory, with some studies suggesting that AhR is deleterious (Korecka et al., 2016), while others suggest that AhR is

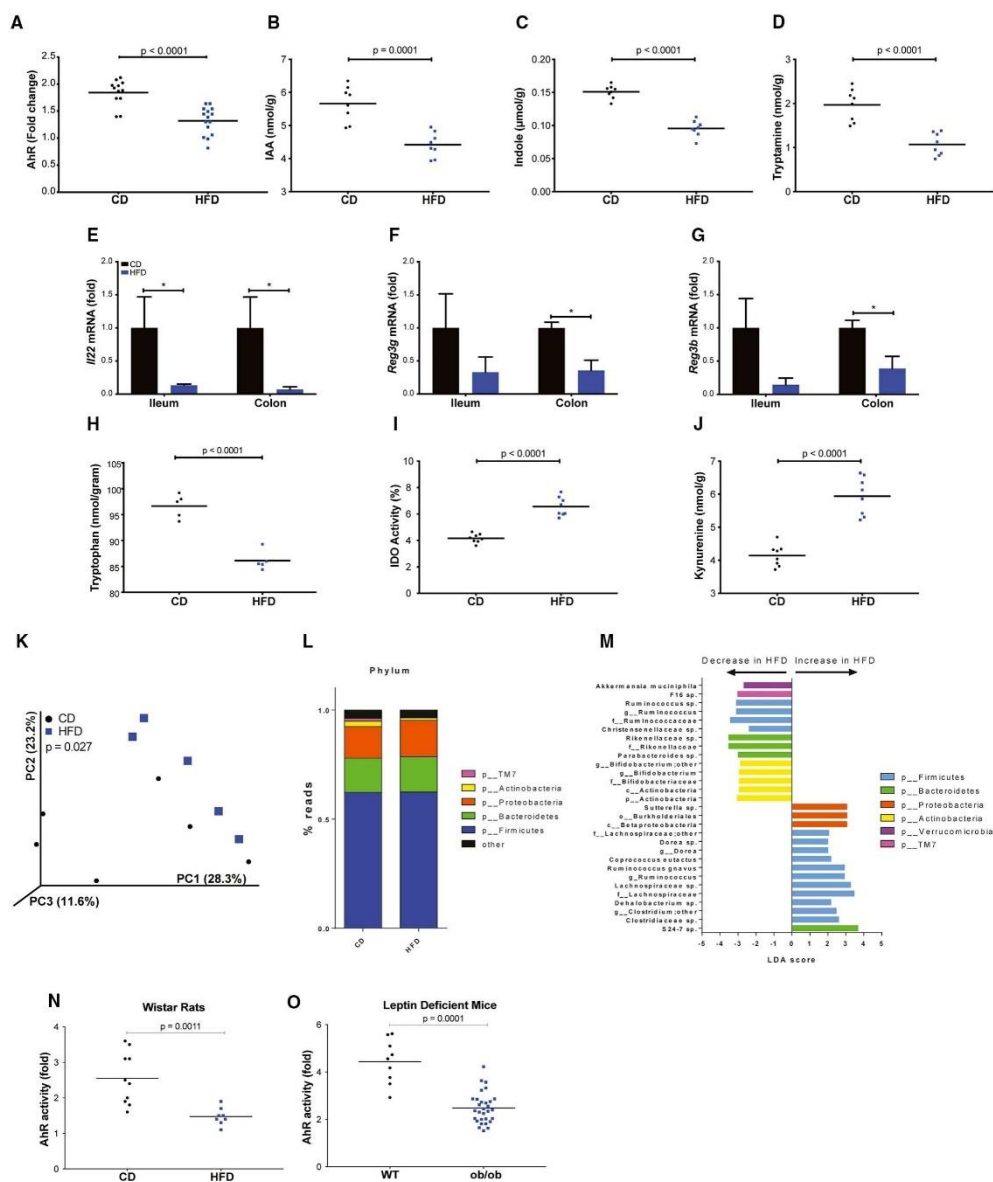


Figure 2. HFD-Induced Metabolic Syndrome Is Associated with an Altered Microbiota Composition and Impaired Microbiota-Driven AhR Activation

(A) Quantification of the fecal AhR agonist activity of mice fed a CD or HFD for 12 weeks.

(B–D) Fecal concentration of (B) IAA, (C) indole, and (D) tryptamine in the indicated mice.

(E–G) Transcript expression of (E) *Il22*, (F) *Reg3b*, and (G) *Reg3b* in the intestines of CD- and HFD-fed mice ($p < 0.05$, $n = 5$ –6/group).

(legend continued on next page)

Cell Metabolism 28, 737–749, November 6, 2018 739

protective (Wada et al., 2016) against diet-induced metabolic syndrome.

Based on the known altered gut microbiota composition and function and on the clues suggesting abnormal AhR signaling in metabolic syndrome, we hypothesized that impaired production of AhR agonists by the gut microbiota could play a role in metabolic syndrome pathogenesis.

Here, we identify that the fecal samples of individuals with metabolic syndrome display low levels of tryptophan-based metabolites and that this is paralleled by reduced AhR activity of the fecal samples. Similar AhR ligand deficiency is observed in animal models of metabolic syndrome. Treatment with either an AhR agonist or a *Lactobacillus* strain, with high tryptophan metabolizing capabilities, to compensate for the impaired microbiota-derived AhR ligand signaling, reduces glucose dysmetabolism and liver steatosis in animal models. Mechanistically, metabolic improvement is linked to the restoration of the intestinal barrier function and production of the intestinal incretin hormone.

RESULTS

Impaired Microbiota Metabolites and AhR Activity in Individuals with Metabolic Syndrome

To study the relevance of gut microbiota-derived AhR ligands in metabolic syndrome, we analyzed the concentrations of specific microbiota metabolites known to activate AhR in the fecal samples of individuals with metabolic syndrome and healthy subjects (Table S1). Fecal samples from obese individuals (body mass index [BMI] > 30) showed lower concentrations of AhR agonists, including indole, indole acetic acid (IAA), 3-methylindole, and tryptamine, compared to those from non-obese individuals (Figures 1A and S1A–S1D). Furthermore, the abundance of AhR agonists and BMI showed a strong negative correlation (Figures 1B and S1E). Individuals displaying metabolic risk factors, such as type 2 diabetes (T2D) and high blood pressure (HBP), similarly showed lower fecal concentrations of AhR ligands (Figures 1C and 1D). In contrast, the concentration of kynurenine, a tryptophan metabolite produced by the host cells through the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO), which is implicated as a key contributor to the development of chronic inflammatory diseases (Prendergast et al., 2011), was significantly increased in the fecal samples of individuals with metabolic syndrome (Figures 1E–1H), a result consistent with the low-grade chronic intestinal inflammation associated with metabolic disorder (Ding and Lund, 2011; Gulhane et al., 2016; Luck et al., 2015).

To investigate the functional relevance of the tryptophan-based metabolite deficiencies, we investigated the capacity of the fecal samples from individuals displaying risk factors for metabolic syndrome to activate AhR *in vitro*. Consistent with

low levels of metabolites, AhR agonist activity of fecal samples from individuals with metabolic syndrome was significantly lower compared to healthy subjects (Figures 1I–1L and S1F–S1H). Collectively, these clinical data demonstrate an alteration of the production of microbiota-derived AhR ligands in metabolic syndrome and suggest a potential role in its pathogenesis.

Altered Microbiota Composition and Reduced Microbiota-Derived AhR Ligands in Animal Models of Metabolic Syndrome

To investigate the causative link between the altered production of microbiota-derived AhR ligands and metabolic syndrome pathogenesis, we used pre-clinical animal models of metabolic diseases. In line with the clinical results, the colon content of the HFD-fed mice, which displayed features of metabolic disorders including glucose intolerance and hepatic steatosis (Figures S2A–S2K), showed decreased AhR agonist activity and lower concentrations of microbiota-derived AhR ligands compared with that of conventional diet (CD)-fed mice (Figures 2A–2D). Additionally, similar to previous reports (Wang et al., 2014), HFD-fed mice displayed lower intestinal expression of *Il22*, *Reg3g*, and *Reg3b*, which are AhR target genes (Figures 2E–2G). Total tryptophan concentration was significantly lower in the colon of HFD compared to CD (Figure 2H). On the other hand, IDO activity and the concentration of kynurenine were significantly increased in the colon content of the HFD group (Figures 2I and 2J).

The decreased AhR metabolic activity of the HFD microbiota was associated with a different profile from that of the CD microbiota (Figure 2K), but no difference in total bacterial abundance was observed (Figure S2L). Specifically, the HFD microbiota showed a relative increase in bacteria belonging to the Lachnospiraceae and Clostridiaceae families and to Proteobacteria phylum, whereas there was a lower abundance of bacteria from the Rikenellaceae and Bifidobacteriaceae families and of *Akkermansia muciniphila* than that in the CD microbiota (Figures 2L and 2M).

To specifically demonstrate that the altered microbiota composition and/or function is causal in the defective production of AhR agonists, we performed a fecal microbiota transplantation experiment. Germ-free mice fed a conventional diet were colonized with the fecal microbiota of either CD-fed or HFD-fed mice. AhR activity in stool assessed 3 weeks later showed a significantly lower level in mice colonized with HFD-fed microbiota, demonstrating a causal effect of microbiota alterations in the decreased production of AhR agonists (Figure S2M).

Finally, lower AhR activity was similarly observed in the colon contents of HFD-fed rats and in a murine model of genetically induced metabolic disorder (leptin-deficient, *ob/ob* mice) (Figures 2N and 2O), although the bacterial composition was

(H–J) Quantification of (H) tryptophan concentration, (I) IDO activity, and (J) kynurenine concentration in the colon mucosa of CD- and HFD-fed mice.

(K) Principal coordinate analysis (PCoA) plot of Bray Curtis distances of the fecal microbiota of the CD-fed or HFD-fed mice (Anosim test; 9,999 permutations).

(L) Fecal bacterial proportion at phylum level.

(M) Discriminant analysis (LEFSE) of the fecal microbiota between the CD and HFD groups.

(N) Quantification of the fecal AhR agonist activity of rats fed a CD or HFD for 12 weeks.

(O) Quantification of the fecal AhR activity of *ob/ob* and wild-type (WT) mice fed a CD at 6 weeks of age.

For (A)–(J), N, and O, statistical comparisons were carried out by normality testing using the Kolmogorov-Smirnov test and subsequent unpaired t tests or Mann-Whitney tests. Data are represented as means ± SEM.

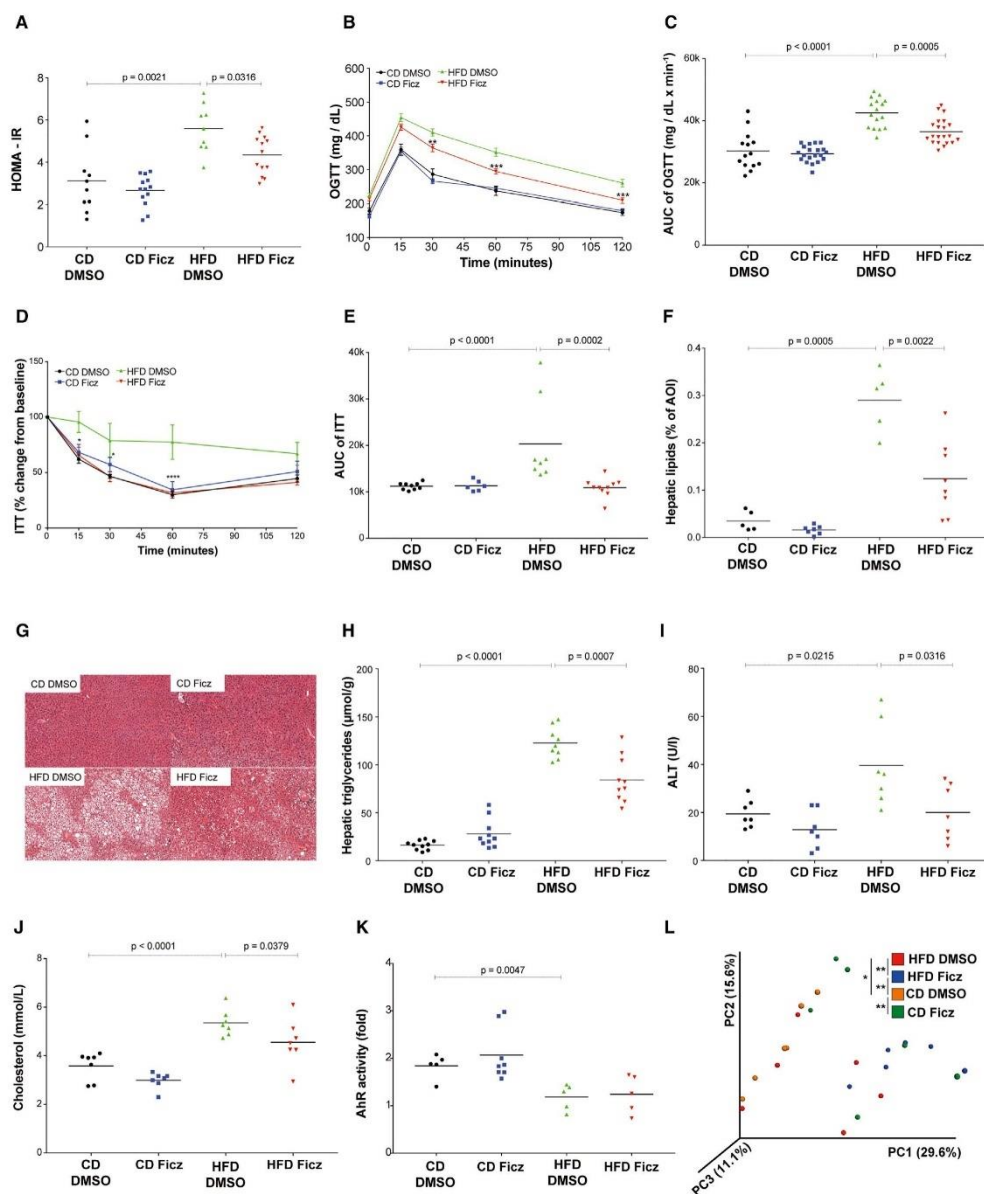


Figure 3. Treatment with an AhR Agonist Alleviates Diet-Induced Metabolic Impairments

(A) The fasting homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) of CD- and HFD-fed mice treated with FicZ or vehicle (DMSO). (B) Blood glucose level before and after the oral glucose tolerance challenge of CD- and HFD-fed mice treated with FicZ or vehicle (OGTT; comparison versus HFD, $n = 12$ –20/group).

(legend continued on next page)

Cell Metabolism 28, 737–749, November 6, 2018 741

different in HFD-fed and *ob/ob* mice (Figure S2N). These results demonstrate that reduced production of microbiota-derived AhR ligands is a trans-species signature profile of metabolic disease.

Treatment with AhR Agonist Reduces Features of HFD-Induced Metabolic Syndrome

To investigate the physiological importance of impaired microbiota AhR activity, 6-formylindolo(3,2-b)carbazole (FicZ), an AhR agonist, was administered to HFD-fed mice. The FicZ treatment did not significantly affect weight gain (Figure S6A), but it did improve glucose metabolism, as observed through a homeostatic model assessment-insulin resistance method (HOMA-IR), in the HFD group (Figures 3A, S6B, and S6C). HFD-fed mice also showed better glucose clearance during the oral glucose tolerance test (OGTT) and higher insulin sensitivity during the insulin tolerance test (ITT) (Figures 3B–3E). Improved features of fatty liver, characterized by lower hepatic triglycerides and lower serum concentrations of liver-specific enzyme alanine transaminase (ALT), but not aspartate aminotransferase (AST), were observed in FicZ-treated mice (Figures 3F–3I and S6D). Finally, lower levels of plasma cholesterol were also observed in FicZ-treated mice compared to non-treated (Figure 3J).

FicZ was unable to correct the impaired AhR agonist production of the microbiota or the microbiota composition (Figures 3K and 3L) but was sufficient to restore intestinal expression of *Cyp1a1* and *Il-22*, which are target genes of AhR activation (Figure S7), thus highlighting the efficacy of the FicZ treatment in compensating for the decreased microbiota-specific AhR signaling. The AhR-dependent mechanism of FicZ was confirmed by its lack of efficacy in treating metabolic syndrome in HFD-fed *AhR*^{−/−} mice (Figure S4).

Treatment with AhR Agonist Reduces Features of Genetic-Induced Metabolic Syndrome

We further investigated the therapeutic value of FicZ in the leptin-deficient *ob/ob* mice, a mutant mice strain that profoundly develops metabolic syndrome due to excessive eating. Similar to HFD, FicZ did not significantly affect weight gain in *ob/ob* mice (Figure S5A). However, FicZ-treated *ob/ob* mice showed significantly lower fasting glucose than non-treated ones (Figure 4A), but no difference was observed for fasting insulin and HOMA-IR (Figures S5B and S5C). Fasting glucose was similar between WT and *ob/ob* mice, but fasting insulin was dramatically higher in *ob/ob*, suggesting that at this stage, hyperglycemia is still controlled by overproduction of insulin. Furthermore, FicZ treatment was efficient in decreasing glucose and insulin dysmetabolism in *ob/ob* mice, as assessed by OGTT and ITT, respectively

(Figures 4B–4E). FicZ-treated *ob/ob* mice further displayed reduced features of hepatic dysfunction, characterized by lower hepatic lipids and lower serum ALT, but not AST (Figures 4F–4I and S5D). Moreover, serum triglyceride levels were significantly reduced in FicZ-treated *ob/ob* mice (Figure 4J). Taken together, these results demonstrate that AhR agonist FicZ has a therapeutic effect in both HFD- and genetic-induced metabolic syndrome.

Supplementation with *L. reuteri* that Highly Produces AhR Ligands Improves Metabolic Syndrome

We next investigated whether administration of a previously isolated *Lactobacillus reuteri* strain that naturally exhibits high AhR-ligand production (Lamas et al., 2016) can similarly reverse the diet-associated metabolic dysfunction. *L. reuteri* supplementation was sufficient to rescue the impaired AhR activity of the gut microbiota of HFD-fed mice (Figure 5A). *L. reuteri* treatment did not significantly affect weight in all groups (Figure S5E), but it recapitulated the improvements demonstrated by FicZ treatment. In particular, *L. reuteri*-supplemented HFD mice showed improved HOMA-IR, improved glucose clearance, and better insulin sensitivity than non-supplemented mice (Figures 5B–5F). Furthermore, HFD-*L. reuteri* group displayed a lower fasting insulin level, but not fasting glucose (Figures S5F and S5G). HFD-*L. reuteri* also showed improved liver histology as well as lower levels of hepatic triglycerides and serum ALT and triglycerides, but not AST (Figures 5G–5J and S5H). When administered in *AhR*^{−/−} mice in HFD context, the *L. reuteri* strain did not exhibit beneficial effects on glucose clearance during OGTT (Figures S6A and S6B) and on steatosis (Figures S6C and S6D), showing that one of the major mechanisms of action of this strain is AhR dependent. Finally, another *Lactobacillus* strain that does not exhibit AhR-ligand production (Figure S6E) did not have any beneficial effects on glucose clearance during OGTT (Figures S6F and S6G) and on steatosis (Figures S6H and S6I). Overall, this underscores that microbiota-specific AhR activation is instrumental in the maintenance of metabolic homeostasis.

Restoration of AhR Activity Improves Intestinal Barrier Function in an Animal Model of Metabolic Syndrome

We next explored the potential mechanisms of action underlying the positive effect of the restoration of AhR activity in metabolic syndrome. Intestinal barrier dysfunction and low-grade inflammation have been widely accepted as distinctive features of metabolic disorders. Hence, we next determined whether activation of AhR signaling affects intestinal barrier function by

(C) AUC of the OGTT.

(D) Blood glucose levels before and after the ITTs (comparison versus HFD, n = 6–10/group).

(E) AUC of the ITT.

(F) Lipid area, calculated as the percent area of interest (AOI), in the liver cross-sections of CD- and HFD-fed mice treated with FicZ or vehicle.

(G) Representative pictures of H&E-stained liver sections from CD- and HFD-fed mice treated with FicZ or vehicle.

(H) Liver triglycerides after 6 hr of food deprivation.

(I and J) Concentrations of (I) alanine transaminase (ALT) and (J) total cholesterol from the sera of indicated mice.

(K) The AhR activity of stools from mice fed a CD or HFD for 12 weeks and treated with AhR agonist FicZ or vehicle.

(L) Principal coordinate analysis (PCoA) plot of Bray Curtis distances of the fecal microbiota of the CD-fed or HFD-fed mice and treated with AhR agonist FicZ or vehicle (Anosim test; 9,999 permutations).

For all data, statistical comparisons were carried out by normality testing using the Kolmogorov-Smirnov test and subsequent ANOVAs or Kruskal-Wallis tests with Bonferroni or Dunn's post hoc tests (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Data are represented as means ± SEM.

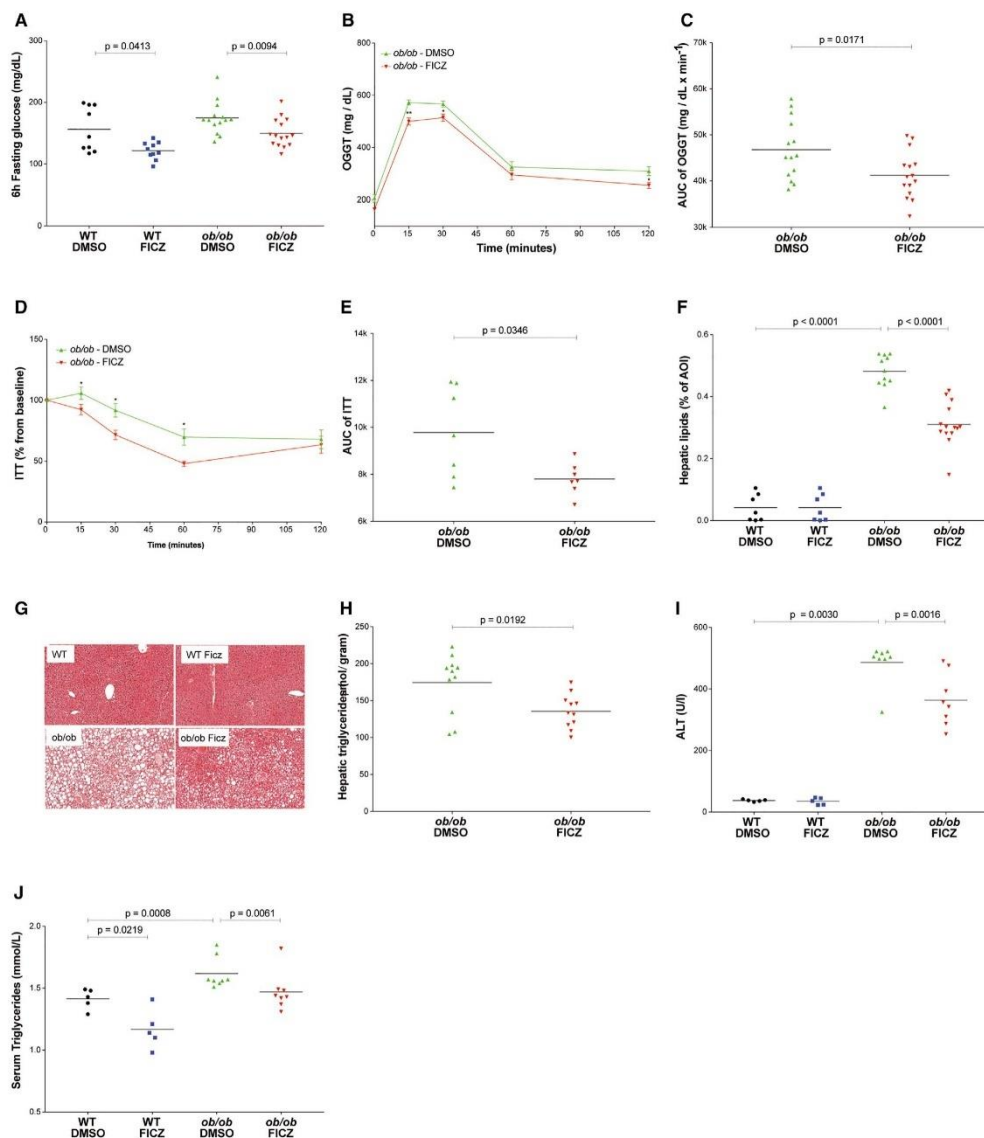


Figure 4. Treatment with an AhR Agonist Alleviates Genetic-Induced Metabolic Impairments

(A) Blood glucose level after 6 hr of fasting in wild-type (WT) and *ob/ob* mice treated with Ficz or vehicle.
 (B) Blood glucose level before and after the oral glucose tolerance challenge of *ob/ob* mice treated with Ficz or vehicle ($n = 14$ – 15 /group).
 (C) AUC of the OGGT.
 (D) Blood glucose levels before and after the ITTs ($n = 7$ – 8 /group).
 (E) AUC of the ITT.
 (F) Lipid area, calculated as the percent area of interest (AOI), in the liver cross-sections of CD- and HFD-fed mice treated with Ficz or vehicle.

(legend continued on next page)

evaluating the permeability of different intestinal segments using an Ussing chamber system. Similar to findings from previous studies reporting barrier dysfunction in HFD-fed animals (Johnson et al., 2015), we found that the HFD-fed mice showed higher translocation of fluorescein-labeled lipopolysaccharide (F-LPS) and other permeability markers, namely fluorescein-labeled sulfonic acid (FS4) and antonia-red-labeled dextran (ARD4), than did the CD-fed mice, particularly in the colon and jejunum (Figures 6A and S7). The Ficiz treatment was effective in decreasing the barrier dysfunction in the HFD-fed mice (Figure 6A).

To confirm whether the barrier improvement was specific to Ficiz signaling, we used a reductionist system involving a human intestinal epithelial cell line. Ficiz stimulation prevented the TNF- α -induced decrease in trans-epithelial electric resistance (TEER) and increased translocation of fluorescein-labeled dextran (FD4) *in vitro* (Figures 6B and 6C).

We next determined the relevance of increased permeability in HFD-fed mice by measuring the serum concentration of soluble CD14 (sCD14), which is released from monocytes after LPS activation and is thus used as a surrogate marker for systemic LPS availability. The HFD-fed mice, compared with the CD-fed mice, showed elevated levels of serum sCD14, and the Ficiz treatment in the HFD-fed mice significantly prevented the serum sCD14 elevation (Figure 6D). In addition, the Ficiz-treated HFD mice, as compared with the untreated mice, showed decreased levels of systemic inflammatory markers, which were characterized by decreased TNF- α and IFN- γ production by splenic cells (Figures 6E and 6F). Globally, these results show that the beneficial effects of AhR agonist involve the correction of the intestinal barrier defect associated with metabolic syndrome.

AhR Ligand Induces the Secretion of the Incretin Hormone GLP-1

Besides their effects on intestinal barrier function, AhR agonists might have other targets in the gut explaining their beneficial effects in metabolic syndrome. Microbiota-derived indole has been shown to be efficient in stimulating the secretion of the incretin hormone GLP-1 from intestinal enteroendocrine cells (EECs) (Chimerel et al., 2014), but a potential link with AhR has not been investigated. In accordance with findings from previous reports (Richards et al., 2016), we observed significantly lower expression of intestinal *proglucagon* (*Gcg*), which encodes GLP-1, and decreased levels of total GLP-1 in the plasma of HFD-fed mice than in the plasma of CD-fed mice (Figures 7A and 7B). The Ficiz treatment restored intestinal mRNA expression of *Gcg* and plasma GLP-1 levels in the HFD-fed mice.

To explore whether AhR agonists directly stimulate the production of GLP-1, the GLUTag cell line, which is a murine EEC line that expresses the *Gcg* gene, secretes GLP-1 (Drucker et al., 1994), and expresses AhR, was stimulated with Ficiz. Ficiz promoted strong GLP-1 secretion to levels comparable to that observed when GLUTag cells were stimulated with Forskolin, a strong inducer of GLP-1 secretion that acts through G pro-

tein-coupled receptors (Lan et al., 2012). This effect was AhR specific because the response disappeared in the presence of an AhR antagonist (Figure 7C). Together, these data show a novel mechanism by which microbiota-dependent AhR signaling may contribute to the outcome of metabolic dysfunction through modulation of GLP-1 production.

DISCUSSION

Metabolic syndrome and its associated conditions, such as obesity, T2D, and non-alcoholic fatty liver disease, are major health concerns worldwide (Sonnenburg and Bäckhed, 2016). Compositional microbiota alterations have been described in metabolic disorders (Ley et al., 2005, 2006; Ridaura et al., 2013; Turnbaugh et al., 2006), but the functional alteration of the gut microbiota and their role in disease pathogenesis remain poorly defined.

The microbiota-derived tryptophan metabolites, such as indole, which are ligands for AhR, have a major role in intestinal homeostasis (Lamas et al., 2018) and have been implicated in pathogenesis of inflammatory bowel disease (Lamas et al., 2016). Several reports suggested a possible role of AhR in metabolic syndrome pathogenesis, and an altered activation of AhR target genes has been observed in the gut of mice with metabolic syndrome (Wang et al., 2014). Here, we asked whether the production of AhR agonists by the gut microbiota is altered in metabolic syndrome and if it has a role in the disease pathogenesis.

We show that the microbiota of humans with metabolic syndrome and of animal models of metabolic syndrome exhibit impaired AhR agonist activity, which was consistent with lower AhR ligand concentrations. Changes in microbiota-derived AhR ligands was associated with shifts in microbiota composition, a result reminiscent of previous reports showing that the microbiota of obese humans and animals contain higher levels of Firmicutes and lower levels of Bacteroidetes (Ley et al., 2005, 2006). While these results highlight the importance of both the composition and function of the microbiota, the causal relevance of these changes remained contentious. Hence, using diet- and genetic-induced animal models of metabolic syndrome, we explored the crosstalk between AhR and microbiota metabolites in the regulation of metabolic function.

AhR activation leads to myriad cellular pathways including IL-22 signaling, which has been shown to alleviate metabolic disorders (Wang et al., 2014). Due to contradictory results from studies using either mice that lack AhR or AhR antagonist, doubts about the specific involvement of AhR in metabolic diseases have been cast. AhR is widely distributed on different cell types in mammalian body, both in systemic and mucosal compartments, and is able to respond to different ligands with varying structure and physiochemical properties; thus, the effect of AhR signaling may be dependent on the targeted organ, the differences in AhR ligand-binding capacity, and downstream activities. The aim of our study was to elucidate the specific contribution of

(G) Representative pictures of H&E-stained liver sections from indicated mice.

(H) Liver triglycerides after 6 hr of food deprivation.

(I and J) Concentrations of (I) alanine transaminase (ALT) and (J) total triglycerides from the sera of indicated mice.

For all data, statistical comparisons were carried out by normality testing using the Kolmogorov-Smirnov test and subsequent ANOVAs or Kruskal-Wallis tests with Bonferroni or Dunn's post hoc tests (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Data are represented as means $\pm$ SEM.

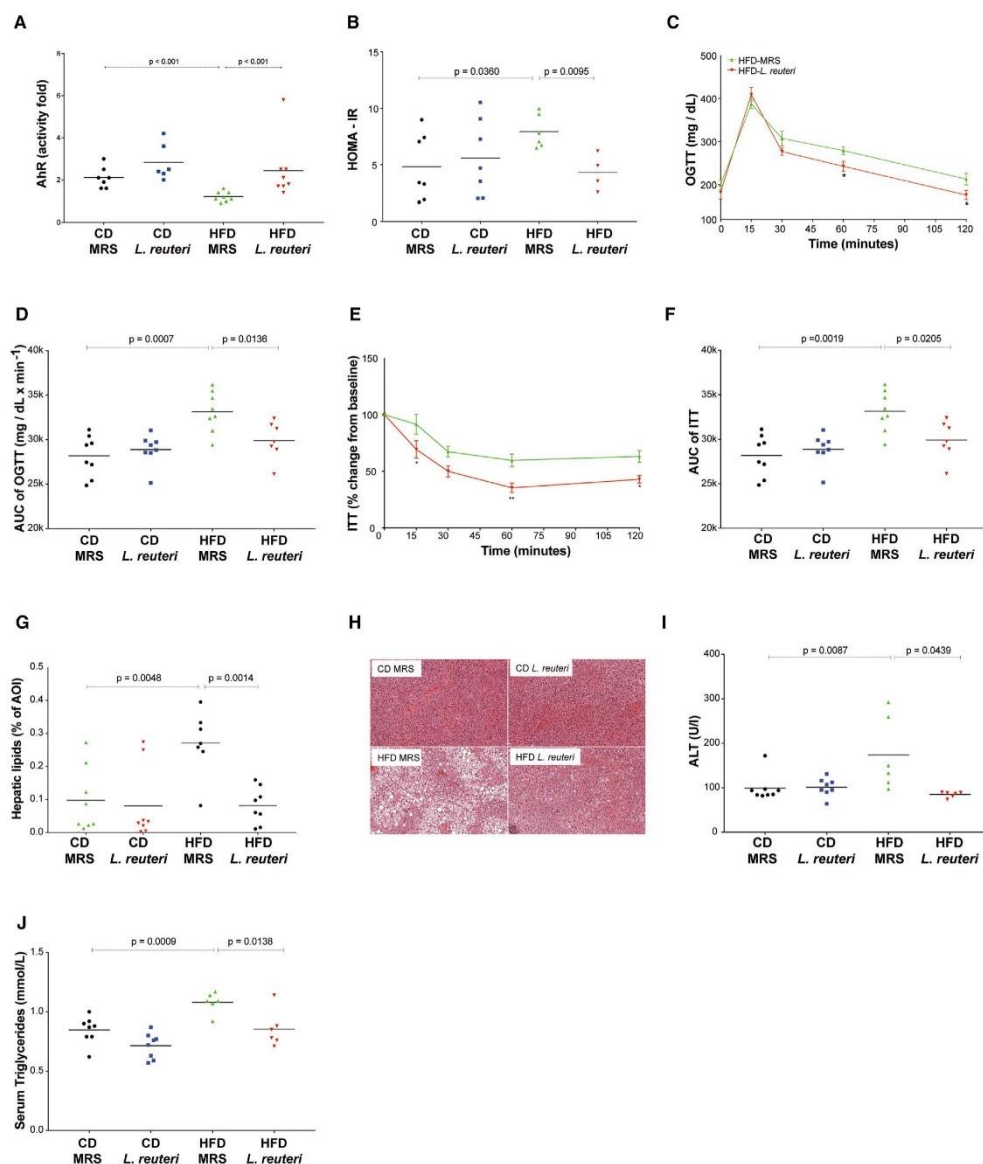


Figure 5. Supplementation with High AhR Ligand-Producing Bacteria Alleviates Diet-Induced Metabolic Impairments

(A) Quantification of the fecal AhR agonist activity of mice fed CD or HFD supplemented with *L. reuteri* or vehicle.
 (B) The fasting HOMA-IR of CD- and HFD-fed mice supplemented with *L. reuteri* or vehicle.
 (C) Blood glucose levels before and after the OGTTs of CD- and HFD-fed mice supplemented with *L. reuteri* or vehicle (n = 8/group).
 (D) AUC of the OGTT.
 (E) Blood glucose levels before and after the ITTs (n = 7–8/group).

(legend continued on next page)

Cell Metabolism 28, 737–749, November 6, 2018 745

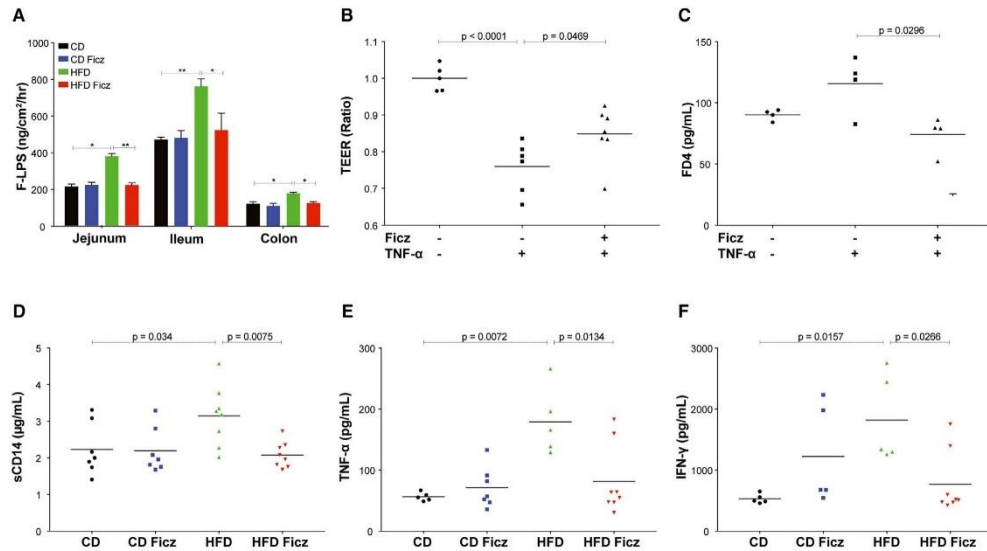


Figure 6. Treatment with an AhR Agonist Improves HFD-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Restores Impaired Incretin Secretion
(A) Translocation of LPS in different intestinal tissues mounted in an Ussing chamber (n = 6–12/group). (B) TEER of Caco-2 cells treated with TNF- α or vehicle in the presence of Ficz or vehicle. (C) Translocation of FD4 (fluorescein conjugated dextran) across intestinal epithelial cell monolayer *in vitro*. (D) Serum concentrations of soluble CD14 (sCD14) of indicated mice. (E and F) TNF- α (E) and IFN- γ (F) production by spleen cells after stimulation with PMA and ionomycin. For all data, statistical comparisons were carried out by first testing normality using Kolmogorov-Smirnov tests and then performing ANOVAs or Kruskal-Wallis tests with Bonferroni or Dunn's post hoc tests. Data are represented as means $\pm$ SEM.

microbiota-derived AhR ligands in modulating metabolic diseases. Thus, to avoid these pitfalls and in accordance with our specific question, we employed a strategy that involves compensating the deficiency in microbiota-derived AhR signaling.

To fully understand the system, we chose to supplement the animal models with interventions that have two different ways of compensation. In particular, *L. reuteri* compensates for impaired AhR signaling by increasing the availability of intestinal metabolites able to signal through AhR, while Ficz directly signals through AhR. Both interventions effectively improve metabolic impairments, and underscore that microbiota-specific AhR activation is instrumental in the maintenance of metabolic homeostasis.

Intestinal barrier dysfunction and low-grade inflammation are distinctive features of metabolic diseases (Everard and Cani, 2013). A leaky gut permits the passage of microbial products, such as LPS, across the mucosa. This passage causes meta-

bolic endotoxemia, which manifests as a moderate increase in the plasma LPS concentration. This phenotype is observed in humans and animals with metabolic syndrome and has been shown to trigger the systemic inflammatory reaction that drives metabolic disease (Cani et al., 2007, 2008; Shi et al., 2006). In light of these data, we sought to determine whether activation of AhR signaling in the gut affects intestinal barrier function by evaluating the intestinal permeability. The Ficz treatment was efficient in correcting the barrier dysfunction as well as subsequent systemic LPS bioavailability and inflammation in HFD-fed mice. Similar studies have demonstrated the efficacy of Ficz in reversing hypoxia-driven intestinal barrier dysfunction (Han et al., 2016) and the importance of AhR ligands, especially bacteria-derived indole metabolites, in regulating mucosal and epithelial barrier integrity (Li et al., 2011; Qiu et al., 2012; Venkatesh et al., 2014; Zelante et al., 2013). Thus, together with our results, these data highlight the beneficial effect of AhR signaling at

(F) AUC of ITT.

(G) Lipid area in the liver cross-sections of CD- and HFD-fed mice supplemented with *L. reuteri* or vehicle.

(H) Representative pictures of H&E-stained liver sections from CD- and HFD-fed mice supplemented with *L. reuteri* or vehicle.

(I and J) Concentrations of (I) alanine transaminase (ALT) and (J) triglycerides in the sera of indicated mice.

For all data, statistical comparisons were carried out by normality testing using the Kolmogorov-Smirnov test and subsequent ANOVAs or Kruskal-Wallis tests with Bonferroni or Dunn's post hoc tests (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Data are represented as means $\pm$ SEM.

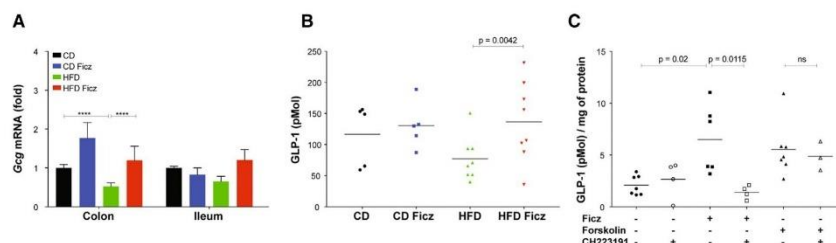


Figure 7. Treatment with an AhR Agonist Promotes Intestinal Incretin Secretion

(A) Expression of *Gcg* in different intestinal segments of the indicated mice (n = 6–8/group).

(B) Serum concentrations of the total GLP-1 of indicated mice.

(C) Quantification of GLP-1 secretion by GLUTag cells after stimulation with Ficz and Forskolin (positive control) in the presence or absence of the AhR antagonist (CH223191).

For all data, statistical comparisons were carried out by first testing normality using Kolmogorov-Smirnov tests and then performing ANOVAs or Kruskal-Wallis tests with Bonferroni or Dunn's post hoc tests. Data are represented as means $\pm$ SEM.

the epithelial cell level. Interestingly, it has been recently shown that *L. reuteri* is able to reprogram intraepithelial CD4⁺ T cells into immunoregulatory T cells in an AhR-dependent manner (Cervantes-Barragan et al., 2017), suggesting another possible mechanism for improvement of intestinal barrier integrity in metabolic syndrome context.

We further showed that AhR signaling is able to induce the secretion of the incretin hormone GLP-1 from intestinal EECs. GLP-1 has myriad metabolic functions, including roles in glucose homeostasis and liver function, and drugs that mimic GLP-1 actions are now widely used to treat T2D. Overall, our data show a novel mechanism by which microbiota-dependent AhR signaling may contribute to the outcome of metabolic dysfunction. Our results do not allow us to determine whether the alteration of AhR agonist production by the gut microbiota is the primary event in metabolic syndrome pathogenesis. However, the therapeutic effect of the correction of this defect clearly shows its involvement in the pathogenesis. One possible explanation could be that early events in metabolic syndrome pathogenesis lead to alterations of gut microbiota composition and function and notably to a decreased production of AhR agonists, which itself favors the worsening of metabolic syndrome in a kind of vicious circle.

In summary, our study identified a new mechanism linking the gut microbiota to metabolic syndrome. The decreased ability of the microbiota to produce AhR ligands leads to defective mucosal barrier integrity and reduced GLP-1 secretion, and ultimately facilitates the development of more severe metabolic syndrome. Importantly, these results are relevant to humans because impaired AhR agonist activity is similarly observed in patients with metabolic syndrome. In addition to providing key evidence of the importance of the microbiota composition and function in the maintenance of host metabolic homeostasis, this study lays the groundwork for further studies aiming to pharmacologically correct the AhR ligand deficiency in metabolic disorders by using techniques such as supplementation with natural AhR ligand-producing bacteria. In conclusion, our data pave the way for new preventive or curative treatments of metabolic syndrome.

Limitation of the Study

The defect in AhR agonist production by the gut microbiota in metabolic syndrome was observed in humans and was confirmed in both rats and mice. However, all the experiments evaluating the effects of correcting this defect were carried out in mice, which can be seen as a potential limitation. Further interventional studies in human should be done in the future to evaluate the proposed therapeutic strategy.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mice
 - Metabolic Syndrome Cohort
- METHOD DETAILS
 - Animal Treatments
 - Fecal Microbiota Transplantation
 - Measurement of AhR Activity
 - Metabolite Measurements
 - 16 s rRNA Gene Sequencing
 - Oral Glucose Tolerance Test
 - Intraperitoneal Insulin Tolerance Test
 - Measurements of Plasma Parameters
 - Liver Histology and Hepatic Triglyceride Measurement
 - *In Vivo* Intestinal Permeability and Plasma sCD14 Measurements
 - Intestinal Permeability Measurements in Using Chambers
 - Monolayer Preparation and TEER Measurement
 - GLP-1 Secretion
 - Cytokine Quantification
 - Gene Expression Analysis Using Quantitative Reverse-Transcription PCR
 - Fecal Bacterial Quantification

- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and two tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.001>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the members of the animal facilities of INRA-Jouy-en-Josas and Saint-Antoine Hospital (UMR S938, PHEA) for their assistance with the animal experiments. Our study benefited from the facilities and expertise of the @BRDIGE Histological platform of UMR 133 GABI and Biochemistry platform of UMR 1149 Inflammation Research Center. J.M.N. holds a fellowship from the Canadian Association of Gastroenterology and Canadian Institute of Health Research. This project received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC-2016-StG-71577).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.M.N., A.A., and H.S. conceptualized and designed the study and performed the data analysis. J.M.N. and A.A. conducted all experiments, unless otherwise indicated. B.L., R.M., M.-L.M., M.S., S.J., G.d.C., C.B., B.S., J.P., C. McQuitty, C. Michaudel, J.G., L.D., M.M., and M.L.R. provided technical assistance for the *in vitro* and *in vivo* experiments. M.L.G., A.C.J., A.B., and H.D. performed experiments with the *ob/ob* mice and rats. H.S., C.C.-N., R.R., E.L., B.H., J.-M.L., and H.D. provided the human clinical data and samples. J.M.N., R.J.X., P.L., H.D., A.B., E.L., M.L.G., and H.S. discussed the experiments and results. J.M.N., A.A., and H.S. wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

Patents related to this work: EP 15306303.7 and EP16306300.1. H.S. and P.L. are co-founders of Nextbiotix. J.M.N. is currently an employee of Nestlé.

Received: October 26, 2017

Revised: May 11, 2018

Accepted: July 6, 2018

Published: July 26, 2018

REFERENCES

- Blacher, E., Levy, M., Tatirovsky, E., and Elinav, E. (2017). Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity. *J. Immunol.* 198, 572–580.
- Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–1481.
- Cervantes-Barragan, L., Chai, J.N., Tianero, M.D., Di Luccia, B., Ahern, P.P., Merriman, J., Cortez, V.S., Caparon, M.G., Donia, M.S., Gillfillan, S., et al. (2017). *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4⁺CD8⁺ T cells. *Science* 357, 806–810.
- Chimerel, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2014). Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Rep.* 9, 1202–1208.
- Crane, J.D., Palanivel, R., Mottillo, E.P., Bujak, A.L., Wang, H., Ford, R.J., Collins, A., Blüner, R.M., Fullerton, M.D., Yabut, J.M., et al. (2015). Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Med.* 21, 166–172.
- Ding, S., and Lund, P.K. (2011). Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 14, 328–333.
- Drucker, D.J., Jin, T., Asa, S.L., Young, T.A., and Brubaker, P.L. (1994). Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol. Endocrinol.* 8, 1646–1655.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461.
- Esser, C. (2009). The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem. Pharmacol.* 77, 597–607.
- Everard, A., and Cani, P.D. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 73–83.
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722–726.
- Furue, M., Takahara, M., Nakahara, T., and Uchi, H. (2014). Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 769–779.
- Garner, C.E., Smith, S., de Lacy Costello, B., White, P., Spencer, R., Probert, C.S., and Ratcliffe, N.M. (2007). Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB J.* 21, 1675–1688.
- Gulhane, M., Murray, L., Lourie, R., Tong, H., Sheng, Y.H., Wang, R., Kang, A., Schreiber, V., Wong, K.Y., Magor, G., et al. (2016). High fat diets induce colonic epithelial cell stress and inflammation that is reversed by IL-22. *Sci. Rep.* 6, 28990.
- Han, B., Sheng, B., Zhang, Z., Pu, A., Yin, J., Wang, Q., Yang, K., Sun, L., Yu, M., Qiu, Y., et al. (2016). Aryl hydrocarbon receptor activation in intestinal obstruction ameliorates intestinal barrier dysfunction via suppression of MLCK-MLC phosphorylation pathway. *Shock* 46, 319–328.
- Hao, N., and Whitelaw, M.L. (2013). The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem. Pharmacol.* 86, 561–570.
- Johnson, A.M., Costanzo, A., Gareau, M.G., Armando, A.M., Quehenberger, O., Jameson, J.M., and Olefsky, J.M. (2015). High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. *PLoS One* 10, e0122195.
- Korecka, A., Dona, A., Lahiri, S., Tett, A.J., Al-Asmakh, M., Braniste, V., D'Arienzo, R., Abbaspour, A., Reichardt, N., Fujii-Kuriyama, Y., et al. (2016). Bidirectional communication between the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and the microbiome tunes host metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2, 16014.
- Lamas, B., Richard, M.L., Leducq, V., Pham, H.P., Michel, M.L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T.W., Natividad, J.M., et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* 22, 598–605.
- Lamas, B., Natividad, J.M., and Sokol, H. (2018). Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol.* 11, 1024–1038.
- Lan, H., Lin, H.V., Wang, C.F., Wright, M.J., Xu, S., Kang, L., Juhl, K., Hedrick, J.A., and Kowalski, T.J. (2012). Agonists at GPR119 mediate secretion of GLP-1 from mouse enteroendocrine cells through glucose-independent pathways. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2799–2807.
- Laval, L., Martin, R., Natividad, J.N., Chain, F., Miquel, S., Desclée de Maredous, C., Capronnier, S., Sokol, H., Verdu, E.F., van Hylckama Vlieg, J.E., et al. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut Microbes* 6, 1–9.
- Leavy, O. (2011). Mucosal immunology: the 'AHR diet' for mucosal homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 806.
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11070–11075.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Li, Y., Innocentin, S., Withers, D.R., Roberts, N.A., Gallagher, A.R., Grigorieva, E.F., Wilhelm, C., and Veldhoen, M. (2011). Exogenous stimuli maintain

- intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* 147, 629–640.
- Luck, H., Tsai, S., Chung, J., Clemente-Casares, X., Ghazarian, M., Revelo, X.S., Lei, H., Luk, C.T., Shi, S.Y., Surendra, A., et al. (2015). Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents. *Cell Metab.* 21, 527–542.
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., and Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6, 610–618.
- Murray, I.A., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer* 14, 801–814.
- Prendergast, G.C., Chang, M.Y., Mandik-Nayak, L., Metz, R., and Muller, A.J. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase as a modifier of pathogenic inflammation in cancer and other inflammation-associated diseases. *Curr. Med. Chem.* 18, 2257–2262.
- Qiu, J., Heller, J.J., Guo, X., Chen, Z.M., Fish, K., Fu, Y.X., and Zhou, L. (2012). The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity* 36, 92–104.
- Richards, P., Pais, R., Habib, A.M., Brighton, C.A., Yeo, G.S., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2016). High fat diet impairs the function of glucagon-like peptide-1 producing L-cells. *Peptides* 77, 21–27.
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henricsson, B., Bain, J.R., et al. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341, 1241214.
- Schirmer, M., Smeekens, S.P., Vlamakis, H., Jaeger, M., Oosting, M., Franzosa, E.A., Ter Horst, R., Jansen, T., Jacobs, L., Bonder, M.J., et al. (2016). Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell* 167, 1125–1136.e8.
- Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., and Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12, R60.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015–3025.
- Sonnenburg, J.L., and Bäckhed, F. (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 535, 56–64.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.
- Venkatesh, M., Mukherjee, S., Wang, H., Li, H., Sun, K., Benecet, A.P., Giu, Z., Maher, L., Redinbo, M.R., Phillips, R.S., et al. (2014). Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity* 41, 296–310.
- Wada, T., Sunaga, H., Miyata, K., Shirasaki, H., Uchiyama, Y., and Shimba, S. (2016). Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles against high fat diet (HFD)-induced hepatic steatosis and the subsequent lipotoxicity via direct transcriptional regulation of Socs3 gene expression. *J. Biol. Chem.* 291, 7004–7016.
- Wang, X., Ota, N., Manzanillo, P., Kates, L., Zavala-Solorio, J., Eidenschenk, C., Zhang, J., Lesch, J., Lee, W.P., Ross, J., et al. (2014). Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature* 514, 237–241.
- Zelante, T., Iannitti, R.G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., et al. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Bacterial Strains		
<i>Lactobacillus reuteri</i>	N/A	CNCM I-5022
<i>Lactobacillus helveticus</i>	N/A	CNRZ450
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Control Diet	Envigo	TD.120508
High Fat Diet	Envigo	TD.97222
Glucose	Sigma-Aldrich	G8270
EDTA-coated tubes	Sarstedt	16.444
Heparin-coated tubes	Sarstedt	41.1393.105
Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich	P8139
Ionomycin calcium salt	Sigma-Aldrich	I0634
T-per tissues protein extraction reagent	Thermo Fisher	78510
BCA Protein Assay kit	Thermo Fisher	23252
FITC-dextran 4	TdB	FD4
Critical Commercial Assays		
Insulin Ultrasensitive ELISA kit	Alpco	80-INSMSU-E01
Legendplex Mouse Inflammation Panel	Biologend	740150
IL-6 ELISA kit	R&D	DY406-05
IFN- γ ELISA kit	Mabtech	3321-1H-6
IL-17a ELISA kit	Mabtech	3521-1H-6
TNF- α ELISA kit	Affymetrix eBioscience	88-7324-86
CD14 ELISA KIT	R&D	DY982
LCN2 ELISA kit	R&D	DY1857
Deposited Data		
Sequencing data	NCBI Trace and Short-Read Archive	SRA: AF29742
Figure S4B data	European Nucleotide Archive	ENA: PRJEB27333
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6Jrj	Janvier	SC-C57J-M
Mouse: <i>Ob/Ob</i>	Janvier	N/A
Mouse: <i>AhR</i> ^{-/-}	UMR 7355 CNRS-University of Orleans, France	Fernandez-Salguero et al., 1995

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Furthermore information and requests for reagents may be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Harry Sokol (harry.sokol@aphp.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mice

Male C57BL/6Jrj mice and *ob/ob* mice on the C57BL/6Jrj background were purchased from Janvier (France) and used 1 week after receipt. *AhR*^{-/-} mice were obtained from UMR 7355 CNRS-University of Orleans, France (Fernandez-Salguero et al., 1995). *AhR*^{-/-} on the C57BL/6Jrj background and wild-type mice were housed and bred at Saint Antoine Research Center. *AhR*^{-/-} and C57BL/6Jrj at 5 weeks of age were fed *ad libitum* with a purified control diet (CD, Envigo TD.120508; Table S2) or high fat diet (HFD, 38% kcal fat, dominantly milk fat, Envigo TD.97222; Table S2) for 12 weeks. *Ob/ob* and wild-type mice at 6-7 weeks of age were fed *ad libitum* with standard chow diet (R03, SAFE, Augy, France) for 12 weeks. 6-week-old male Wistar were purchased from Janvier (France), used 1 week after receipt and fed with either standard chow diet or HFD with 45% of energy from lipids and 17% of energy from

sucrose. Animals were weighed weekly, and weekly food consumption was measured in each cage. Except when *in-vivo* permeability experiments were performed, all animals were fasted for 6 hours prior to sacrifice and then anesthetized using isoflurane. Animals were euthanized by cervical dislocation, and appropriate tissues were harvested. All experiments were performed in accordance with the Comité d'Ethique en Experimentation Animale.

Metabolic Syndrome Cohort

All human subjects were selected from three cohorts of Paris Hospitals (Paris, France) and provided informed consent. None of the subjects had received antibiotics during the three months before sampling. Approval for human studies was obtained from the local ethics committees (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France IV, IRB 00003835 Suivittheque study; registration number 2012/05NICB and Dispo cohort, registration number 2016/34 NICB; Comité de Protection des Personnes Ile-de-France III, Mabac cohort, registration number S.C. 3218).

METHOD DETAILS

Animal Treatments

For the AhR agonist treatments, mice were injected i.p. with 6-formylindolo(3,2-b)carbazole (Ficz, Enzo Life Sciences, 1 μ g/mouse) or vehicle (dimethyl sulfoxide [DMSO]) once per week for 12 weeks. For the treatments with bacteria containing strong AhR activity, mice were gavaged daily with 10^9 CFU of *L. reuteri* CNCM I-5022 or vehicle (MRS broth supplemented with 0.05% L-cysteine and 15% glycerol) for 12 weeks.

Fecal Microbiota Transplantation

Fresh stool samples from CD-fed or HFD-fed mice (9-week-old males) were immediately transferred to an anaerobic chamber, in which the stool samples were suspended and diluted in LYHBHI (Brain-heart infusion) medium (BD Difco, Le Pont De Claix, France) supplemented with cellobiose (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), maltose (1 mg/ml; Sigma-Aldrich), and cysteine (0.5 mg/ml; Sigma-Aldrich). These fecal suspensions were used to inoculate mice. WT germ-free mice (4- to 5 week-old females) were randomly assigned to two groups and inoculated via oral gavage with 400 μ l of fecal suspension (1:100) from the CD-fed or HFD-fed mice and maintained in separate isolators. All experiments in CD $\rightarrow$ GF and HFD $\rightarrow$ GF mice were performed three weeks after inoculation.

Measurement of AhR Activity

The AhR activity of human and animal stool samples was measured using a luciferase reporter assay method, as described previously (Lamas et al., 2016). Briefly, H1L1.1c2 cells, which contained the dioxin response element-driven firefly luciferase reporter plasmid pGudLuc1.1, were seeded into a 96-well plate and stimulated with human or animal stool samples for 24 h. Luciferase activity was measured using a luminometer, and the results were normalized on the basis of the negative luciferase activity of the control.

Metabolite Measurements

The metabolite concentrations of the stool samples were quantified as previously described (Lamas et al., 2016). Briefly, L-tryptophan and L-kynurenine were measured via HPLC using a colorimetric electrode assay (ESA Coultronics). The indole derivatives were quantified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, using a Waters ACQUITY ultra performance liquid chromatography system (Garner et al., 2007). IDO activity was assessed by measurement of Kyn/Trp ratio.

16 s rRNA Gene Sequencing

16 s rRNA gene sequencing of the fecal DNA samples (collected after 9 weeks of CD or HFD administration) was performed as previously described (Lamas et al., 2016). Briefly, the V3-V4 region was amplified, and sequencing was performed on an Illumina MiSeq platform (GenoScreen, Lille, France). Raw paired-end reads were subjected to the following process: (1) quality-filtering using the PRINSEQ-lite PERL script by truncating the bases from the 3' end that did not exhibit a quality below 30, on the basis of the Phred algorithm; (2) paired-end read assembly using FLASH (fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies) (Schmieder and Edwards, 2011) with a minimum overlap of 30 bases and a 97% overlap identity; and (3) search and removal of both forward and reverse primer sequences using CutAdapt, with no mismatches allowed in the primer sequences. Assembled sequences for which perfect forward and reverse primers were not found were eliminated. Sequencing data were analyzed using the quantitative insights into microbial ecology (QIIME 1.9.1) software package. The sequences were assigned to OTUs using the UCLUST algorithm (Edgar, 2010) with a 97% threshold of pairwise identity and classified taxonomically using the Greengenes reference database (McDonald et al., 2012). Rarefaction was performed (13,000 sequences per sample) and used to compare the abundance of the OTUs across samples. The alpha diversity was estimated using both the richness and evenness indexes (Chao1, Shannon or number of observed species). The beta diversity was measured by using the Bray Curtis distance matrix and was used to build the PCoA. The linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) algorithm was used to identify taxa that were specific to the diet or treatment (Segata et al., 2011).

Oral Glucose Tolerance Test

OGGT was performed 3-7 days before sacrifice. Mice were fasted by removal of the food and bedding 1 hour before the onset of the light cycle. After 6 hours of fasting, a glucose solution (1 g/kg for *ob/ob* mice; 2 g/kg for all other mice) was administered by oral gavage. Blood glucose levels at time 0 (fasting glucose, taken before glucose gavage) and 15, 30, 60 and 120 min after glucose gavage were analyzed using a OneTouch glucometer (Roche). The glucose level was plotted relative to time, and the AUC was calculated according to the trapezoidal rule. The plasma insulin concentrations (collected in EDTA-coated tubes) at times 0 (fasting insulin) and 30 were analyzed from tail vein blood (collected in EDTA-coated tubes) by using an Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit (Alpco). HOMA-IR was calculated according to the following formula: fasting glucose (nmol/L) x fasting insulin (microU/L)/22.5.

Intraperitoneal Insulin Tolerance Test

ITT was performed 3-7 days before sacrifice. Mice were fasted by removal of the food and bedding 1 hour before the onset of the light cycle. After 6 hours of fasting, an insulin solution (0.5 U/kg) was administered intraperitoneally. Blood glucose levels at time 0 (fasting glucose, taken before glucose gavage) and at 15, 30, 60 and 120 min after the insulin challenge were analyzed using a OneTouch glucometer (Roche). The glucose levels were plotted relative to time, and the AUC was calculated according to the trapezoidal rule.

Measurements of Plasma Parameters

Blood samples were collected in heparin-coated tubes via cardiac puncture and centrifuged. The plasma samples were then stored at -80°C until further analysis. Measurements of plasma cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL), aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) were performed by using the Biochemistry Platform (CRI, UMR 1149, Paris) with an Olympus AU400 Chemistry Analyzer.

Liver Histology and Hepatic Triglyceride Measurement

A slice of the left lobe of the liver was fixed in 4% PFA for 48 h and then transferred to ethanol, fixed in paraffin, trimmed, processed, sectioned into slices that were approximately $3\text{ }\mu\text{m}$ thick, mounted on a glass slide and stained with H&E. Hepatic lipids were evaluated and quantified blindly by using the ImageJ software as previously described (Crane et al., 2015; Schneider et al., 2012).

In Vivo Intestinal Permeability and Plasma sCD14 Measurements

In vivo assays of intestinal barrier function were performed with the fluorescein-conjugated dextran (FITC-dextran, 4 kDa) method, as previously described (Laval et al., 2015). Briefly, on the day of sacrifice, FITC-dextran (0.6 mg/g of body weight) was administered to the mice by oral gavage, and 3 h later, blood samples were collected in heparin-coated tubes. The fluorescence intensity of the plasma was measured using a microplate reader (Tecan). The plasma concentrations of soluble CD14 (sCD14) were measured using a CD14 ELISA kit (R&D) per the manufacturer's instructions.

Intestinal Permeability Measurements in Using Chambers

Segments of the colon, mid-jejunum and distal ileum were cut along the mesenteric border and mounted in Ussing chambers (Physiological instruments), and $0.2\text{--}0.3\text{ cm}^2$ of the tissue area was exposed to 2.5 mL of circulating oxygenated Krebs bicarbonate buffer containing 5 mM KCl, 114 mM NaCl, 2.15 mM CaCl_2 , 1.10 mM MgCl_2 , 25 mM Na_2HCO_3 , 1.65 mM Na_2HPO_4 and 0.3 mM NaH_2PO_4 and maintained at 37°C . Additionally, glucose (10 mM) was added to the serosal buffer as a source of energy and osmotically balanced by mannitol (10 mM) in the mucosal buffer. Fluorescein-labeled lipopolysaccharide (F-LPS; 80 $\mu\text{g/mL}$; Sigma-Aldrich) was used as a probe to assess macromolecular permeability. Additionally, antonia red-labeled dextran (ARD4; 400 $\mu\text{g/mL}$; molecular weight, 4000 Da; TdB) and fluorescein-labeled sulfonic acid (FS4; 40 $\mu\text{g/mL}$; molecular weight, 400 Da; TdB) were simultaneously used to assess paracellular and transcellular permeability. All probes were added to the luminal buffer once equilibrium was reached (10-15 min after mounting the tissues in the chamber). Serosal samples (200 μL) were obtained at 30-min intervals for 2 h and replaced with fresh buffer to maintain constant volume. The fluorescence intensity of the serosal samples was measured using a microplate reader (Tecan), and the concentrations of the probes were calculated from a standard curve. The flux of probes from the mucosa to the serosa was calculated as the average value of two consecutive stable flux periods (60-90 and 90-120 min) and expressed as $\text{ng/cm}^2/\text{h}$.

Monolayer Preparation and TEER Measurement

Caco-2 cells were grown on Transwell semipermeable filter supports (12-mm diameter wells, polystyrene membranes with 0.4-mm pores, Costar-Corning) that were seeded at 1×10^5 cells per well; cells were used 18-20 days after confluence. TEER measurements were performed at time 0 (T0), which occurred before adding Fic3 (175 nM) to both the apical and basal surfaces of the Transwells 3h before the cytokine stimulation, and at the end of the cytokine stimulation (time 36 h, T36). Cells were first stimulated with IFN- γ (10 ng/ml; R&D Systems) for 24 hours to promote expression of TNF- α receptors, followed then stimulated with TNF- α (2.5 ng/ml; R&D Systems) for 12 hours. Cytokines were added to only the basal compartment without manipulation of the apical compartment. Wells without Fic3 and cytokines were used as controls. The TER data are presented as ratios: Ratio = (TER Treatment Time 36/TER Treatment T0)/(TER Control T36/TER Control T0). To examine the flux of fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FD4; molecular weight, 4000 Da; TdB), monolayers were washed after stimulation with Hanks' balanced salt solution (HBSS) and transferred to fresh HBSS; 1 mg/ml of fluorescein isothiocyanate-dextran was added to the apical layer and incubated at 37°C . Samples were removed

from the basal chamber after 120 min. Fluorescence of the basal samples was determined using a fluorescence plate reader (Tecan), and flux was calculated from a standard curve. Experiments were performed twice in triplicate or quadruplicate for a total of two independent experiments.

GLP-1 Secretion

GLP-1 secretion was assessed with an immunoassay from GLUTag (Drucker et al., 1994). Cells were seeded in 24-well plates at 2×10^5 cells per well and cultured for 2–3 days. On the day of the experiment, cells were washed twice with Krebs Ringer solution containing 30 mM KCl, 120 mM NaCl, 0.5 mM CaCl_2 , 0.25 mM MgCl_2 , and 2.2 mM NaHCO_3 supplemented with 0.5% (wt/vol) BSA. Cells were stimulated with Forskolin (10 μM ; Sigma-Aldrich) or Ficz (175 nM; Enzo Pharmaceuticals) in the presence or absence of AhR antagonist CH223191 (10 μM ; Sigma-Aldrich) or vehicle (DMSO) for 2 h in Krebs Ringer solution. GLP-1 concentrations at 0 h and 2 h were measured using a total GLP-1 ELISA kit (Millipore), per the manufacturer's instructions. The GLP-1 concentrations were expressed as the difference at 2 h and 0 h divided by the total cell protein concentration. Experiments were performed twice in triplicate or quadruplicate for a total of two independent experiments.

Cytokine Quantification

Single-cell suspensions from the mesenteric lymph nodes and spleens were isolated by smashing the cells in a 70- μm mesh; 1×10^6 cells were seeded into 24-well plates and stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/mL; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 μM ; Sigma Aldrich) for 48 h at 37°C. Supernatants were collected and used for the cytokine analysis. Cytokines were measured using individual ELISA kits (the Mabtech IFN- γ ELISA kits; and the eBioscience TNF- α ELISA kit).

Gene Expression Analysis Using Quantitative Reverse-Transcription PCR

Total RNA was isolated from different intestinal segments using an RNeasy Mini Kit, according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was performed using a Bio-Rad iScript cDNA Synthesis kit and then a Takyon SYBR Green PCR kit in a StepOnePlus apparatus (Applied Biosystems) with specific mouse oligonucleotides that have been described previously (Lamas et al., 2016). qPCR data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ quantification method with mouse *gapdh* as the endogenous control.

Fecal Bacterial Quantification

Fecal DNA was extracted and bacterial abundance was quantified by qPCR as previously described (Lamas et al., 2016).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

In each experiment, multiple mice were analyzed as biological replicates. No statistical methods were used to predetermine the sample size. Dot plots with a linear scale show the arithmetic mean. Bar graphs are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Except for the 16 s rRNA results, GraphPad Prism version 7.0b was used for statistical analyses. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify that the entire dataset was normally distributed. For datasets that failed normality tests, nonparametric tests were used to analyze significant differences. For comparisons between two groups, significance was determined using the two-tailed Student's *t* test or nonparametric Mann-Whitney test. For comparisons among more than two groups, one way (ANOVA) followed by post hoc Bonferroni tests, nonparametric Kruskal-Wallis tests followed by post hoc Dunn's tests or two-way ANOVA corrected for multiple comparisons with a Bonferroni test were used. An *F* or Bartlett's test was performed to determine differences in variances for *t* tests and ANOVAs, respectively. An unpaired Student's *t* test with Welch's correction was applied when variances were not equal. Differences were noted as significant at $p \leq 0.05$.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

The accession number for the sequencing data reported in this paper is SRA: AF29742 and, for data shown in Figure S4B, ENA: PRJEB27333.

RESUME

Le L-tryptophane (L-trp) est un acide aminé essentiel dont certains métabolites microbiens et humains possèdent des effets immunomodulateurs via leur liaison sur le récepteur aux aryl hydrocarbures (AhR). Ce récepteur est présent au niveau des cellules épithéliales et immunitaires et contrôle, entre autres, le métabolisme des xénobiotiques, la sécrétion de peptides antimicrobiens, la réponse immunitaire mais également la composition du microbiote intestinal. Notre équipe a mis en évidence une diminution de certains métabolites du L-trp activant AhR dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ainsi que dans le syndrome métabolique. Placé à l'interface entre l'hôte et le microbiote, AhR présente un fort potentiel thérapeutique dans les maladies inflammatoires. Décoder les mécanismes de son activation et de sa régulation par les métabolites du microbiote est crucial pour comprendre les conséquences des dysbioses qui font le lit de nombreuses pathologies. L'objectif global de ce projet de thèse est (i) d'étudier les interactions de différentes classes de métabolites bactériens au niveau de AhR et (ii) de décrypter les mécanismes sous-jacents qui entrent en jeu dans la communication entre l'hôte et son microbiote via l'activation de AhR.

Nous avons montré une synergie d'activation de AhR en présence de métabolites du L-trp avec les acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate et acétate) à la fois sur des lignées cellulaires *in vitro* ainsi que sur des explants coliques humains. Nos premières investigations ont montré que le butyrate n'agissait pas comme un ligand de AhR puisqu'il (i) ne se fixait pas au récepteur, (ii) n'induisait ni la translocation nucléaire de AhR, (iii) ni sa dimérisation avec ARNT. L'étude des mécanismes indirects d'activation de AhR a montré que le butyrate (i) n'inhibait pas l'activité des cytochromes de classe 1 responsables de la dégradation des ligands de AhR, (ii) n'agissait pas via ses récepteurs couplés aux protéines G et (iii) n'agissait pas par l'intermédiaire de son activité inhibitrice du protéasome pour activer AhR. En revanche, la synergie semblait reposer sur certaines modifications épigénétiques qui ont été confirmées (i) par méthode d'immunoprécipitation de la chromatine montrant une augmentation du recrutement de AhR au niveau du promoteur de *cyp1a1* lorsque le butyrate était additionné au FICZ et (ii) en utilisant l'inhibiteur de HDAC trichostatine A permettant de mimer l'effet du butyrate sur l'activation de AhR médiée par FICZ.

En conclusion, ces résultats soutiennent l'existence d'interactions complexes entre de multiples métabolites dérivés de l'intestin qui méritent une exploration approfondie. En outre, ils ouvrent la voie à de nouvelles thérapies pour moduler les activités AhR dans l'intestin, en utilisant des produits biothérapeutiques vivants produisant du butyrate et des indoles, ou en utilisant directement des mélanges de métabolites ou via des ligands AhR puissants produits par mimétisme de métabolites microbiens.

Mots clefs : L-tryptophane ; Récepteur aux aryl hydrocarbures ; Métabolites ; Microbiote ; Acides gras à chaîne courte ; Epigénétique