

## COMMUNICATION

### **Microbiote et régénération de l'épithélium intestinal : des signaux cryptiques décryptés dans la crypte**

MOTS-CLÉS : MICROBIOTE. INTESTIN. ÉPITHÉLIUM. CELLULES SOUCHES. RÉGÉNÉRATION

### *Microbiota and gut epithelial regeneration : decrypting cryptic signals in crypts*

KEY-WORDS : MICROBIOTA. INTESTINE. EPITHELIUM. STEM CELLS. REGENERATION

Giulia NIGRO \*, Antonin LEVY \*, Aline STEDMAN \*, Philippe J. SANSONETTI \*

**Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.**

## RÉSUMÉ

*La coévolution entre le microbiote intestinal et les mammifères a créé une symbiose mutualiste dans plusieurs processus physiologiques vitaux comme l'immunité, la nutrition et le métabolisme, la maturation du système nerveux. Nous montrons qu'elle a aussi établi les conditions d'une protection des cellules souches intestinales contre des agressions endogènes ou exogènes, préservant ainsi la régénération épithéliale dans des conditions pathologiques. La reconnaissance du muramyl-dipeptide (MDP) bactérien par le senseur cytosolique Nod2 exprimé à haut niveau dans les cellules souches est centrale dans ce mécanisme cytoprotecteur.*

---

\* Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire et Unité INSERM 1202, Institut Pasteur, 28 Rue du Docteur Roux, 75015, Paris. Chaire de Microbiologie et Maladies Infectieuses, Collège de France, 11 Place Marcelin Berthelot, 75005, Paris

*Tirés-à-part* : Professeur Philippe SANSONETTI  
*Article reçu le 12 juin 2018 et accepté le 25 juin 2018*

## SUMMARY

*Co-evolution between the gut microbiota and mammals has generated a mutualistic symbiosis that concerns several vital physiological processes such as immunity, nutrition/metabolism and late stages of maturation of the nervous system. We show that it has also established conditions for protection of intestinal stem cells against endogenous/exogenous aggression, thereby preserving epithelial regeneration in pathological conditions. Recognition of bacterial muramyl-dipeptide (MDP) by the cytosolic sensor Nod2 which is expressed at high level by stem cells is central to this cytoprotective capacity.*

## INTRODUCTION

L'espèce humaine a co-évolué avec un microbiote, en particulier intestinal qui, de par sa quantité et sa diversité joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et la survenue ou l'entretien de certaines maladies. L'existence, au sein du métagénome du microbiote intestinal, d'un cœur commun de gènes procaryotes partagé entre individus [1] souligne l'existence d'une symbiose mutualiste qui confère à l'espèce un avantage sélectif [2]. C'est le concept de « superorganisme » ou « holo-biote » [3] et l'observation de souris nées et élevées sans microbes ou axéniques montre l'effet délétère de l'absence de la composante procaryote d'un « superorganisme » mammifère. Les frontières de cette symbiose mutualiste sont activement étudiées, concernant le développement et la physiologie [4]. Au-delà des domaines largement reconnus comme l'effet de barrière à la colonisation par des pathogènes, la maturation et la stimulation soutenue du système immunitaire muqueux et systémique, la dégradation puis la fermentation des polyosides complexes en acides gras à chaînes courtes de haute valeur calorique, la production de certaines vitamines (A, B1, Folates, B12, K) et la dégradation des acides aminés aromatiques (tryptophane), des sels biliaires et des xénobiotiques [5], de nouvelles facettes apparaissent, touchant au développement normal et pathologique de l'individu, comme les phases tardives de maturation du système nerveux central et entérique (« axe intestin-cerveau ») [6] et la régénération tissulaire [7]. C'est cette dernière interface que nous traiterons. L'épithélium intestinal se caractérise par une intense capacité de régénération assurée par des cellules souches résidant dans le fond des cryptes de Lieberkuhn (cellules souches intestinales ou CSI). Des études préliminaires ont montré que le microbiote intestinal participe au processus de régénération, indiquant qu'il peut moduler la prolifération des CSI. Cette modulation pourrait s'effectuer indirectement par la production de molécules régulatrices par les cellules épithéliales ou immunitaires de la paroi intestinale activées par le microbiote, ou directement par l'effet agoniste de molécules issues du microbiote comme les PAMP (pathogen-associated molecular pattern), des motifs bactériens génériques (endotoxine, peptidoglycane, flagelline, etc...) engageant des récepteurs immunitaires innés (pathogens recognition receptors, PRR) exprimés par les CSI ou certains métabolites. Cet article reprend les différentes formes du dialogue moléculaire qui s'instaure entre CSI et microbiote et ses conséquences sur l'homéostasie et la pathologie intestinale.

## Microbiote intestinal et stimulation de la régénération épithéliale

L'épithélium intestinal des mammifères présente une extraordinaire capacité de régénération marquée par un renouvellement complet tous les 4 à 5 jours. Cette propriété garantit une réparation rapide et efficace suite à des altérations, en particulier toxiques ou infectieuses, évitant l'établissement d'une rupture de l'imperméabilité de la barrière épithéliale (« leaky gut »). Elle repose largement sur la présence de CSI à fortes capacités prolifératives, résidant, dans l'intestin des mammifères, au fond des cryptes de Lieberkuhn de l'intestin grêle et du colon. Les CSI sont caractérisées par l'expression du gène *Lgr5* (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) codant pour un des récepteurs de R-spondin [7]. Les CSI se différencient et prolifèrent, fournissant ainsi des cellules progénitrices qui se divisent et se différencient, générant les quatre lignages cellulaires caractéristiques de l'intestin : entérocytes/colonocytes, cellules entéroendocrines, cellules mucipares et cellules de Paneth [8]. L'équilibre autorenewement-prolifération-différenciation est régulée par des signaux issus de l'environnement des CSI. Dans les cryptes de l'intestin grêle — mais pas dans le colon — les cellules de Paneth, étroitement intriquées aux CSI, expriment des ligands des voies Wnt et Notch nécessaires au maintien de l'état souche (« stemness ») des CSI [9]. La crypte intestinale peut maintenant être reproduite *in vitro*, grâce à la mise en culture des cryptes qui permettent, par l'intermédiaire des CSI, le développement de structures tri-dimensionnelles, ou organoïdes (Figure 1), sphères fermées sur lesquelles se différencient des « néo-cryptes » [7]. La préparation en routine d'organoïdes à partir de tissus et d'espèces variables — dont le tissu intestinal humain — a représenté un grand progrès dans l'analyse *in vitro* de la régénération tissulaire dans ses aspects physiologiques et physiopathologiques.

Le microbiote intestinal est impliqué dans le renouvellement épithélial à l'homéostasie comme le suggèrent un raccourcissement du cycle et une diminution de la prolifération cellulaire chez différents animaux axéniques [11-13].

C'est cependant l'utilisation de souris déficientes dans la voie de perception des PAMP — en particulier la cascade TLR4 reconnaissant l'endotoxine des bacilles à Gram négatif (les Toll-like receptors, ou TLR, sont les senseurs extracellulaires des PAMP) — qui a permis de démontrer le rôle du microbiote intestinal dans la régénération épithéliale dans un modèle de colite expérimentale causée par le sulfate de dextran (DSS) [14]. La greffe médullaire de souris déficientes dans la signalisation TLR a permis de rapporter aux macrophages activés de la crypte intestinale la responsabilité du processus de régénération épithéliale efficace en présence de DSS [15]. Par ailleurs, dans un modèle *in vitro* de cicatrisation cellulaire, l'exposition des cellules épithéliales à *Lactobacillus rhamnosus* a montré une accélération de la cicatrisation par l'activation de FAK (focal adhesion kinase), stimulant prolifération et migration cellulaire [16].

C'est enfin par l'exposition d'organoïdes à une batterie de PAMP que nous avons pu démontrer l'existence d'un mécanisme de cytoprotection des CSI induit par le

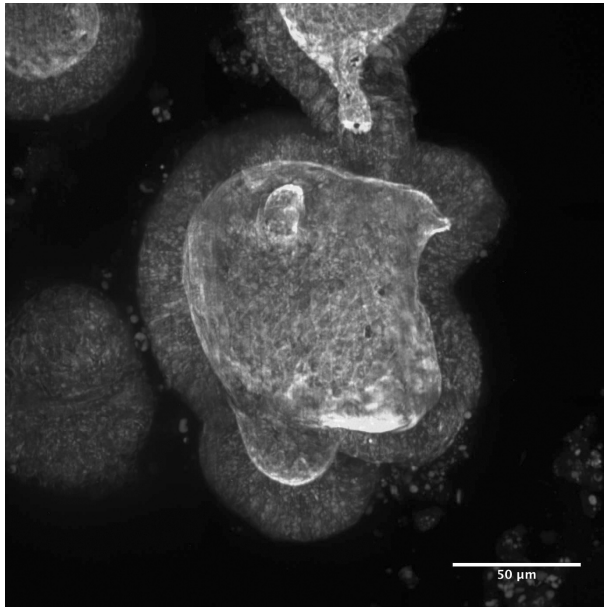


Figure 1 : Organoïde issu de crypte de l'intestin grêle de souris

Outil devenu incontournable dans l'analyse de l'interface environnement-appareil de régénération tissulaire, particulièrement dans le cas de l'analyse du dialogue moléculaire microbiote-cellules souches intestinales.

Section de 300 microns d'épaisseur.

Barre = 50 microns

Marquage anticorps anti Ki67 (marqueur de prolifération cellulaire) = bleu ; phalloïdine (actine définissant le cytosquelette sous-cortical, donc les contours cellulaires) = vert ; dapi (ADN/noyaux cellulaires) = rouge.

Image obtenue par microscopie confocale, système Opterra (Bruker), Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire (Institut Pasteur).

muramyl-dipeptide (MDP), un fragment du peptidoglycane constitutif du mur bactérien perçu par le récepteur cytosolique Nod2 [17] Nous avons montré que Nod2 était exprimé constitutivement à niveau élevé dans les CSI — plus que dans tout autre lignage épithélial — et que la voie MDP-Nod2 était particulièrement efficace dans la cytoprotection des cellules souches préalablement exposées *in vivo* à une drogue cytotoxique comme la Doxorubicine [18] ou par les Rayons X (Lévy et *al.* En préparation). Un autre travail récent a confirmé le rôle de Nod2 dans la réparation épithéliale intestinale [19].

Le microbiote joue donc un rôle de stimulus dans différents aspects de la régénération épithéliale intestinale, à l'homéostasie mais surtout en situation de stress, soit indirectement par l'intermédiaire du macrophage de la crypte, soit directement par

stimulation de la cytoprotection des CSI ou de la motilité des cellules épithéliales. Il est probable qu'alors que les études progressent dans ce domaine, la complexité et la logique du rôle du microbiote dans la régénération épithéliale va se révéler, y compris les fonctions de cellules clés de la niche de la crypte, au-delà des cellules de Paneth et des macrophages, telles que les cellules stromales [20]. Un autre aspect fascinant est la programmation — y compris de nature possiblement épigénétique — induite par les premiers contacts du nouveau-né stérile avec les éléments constitutifs de sa flore intestinale en cours de maturation

### **Microbiote intestinal et contrôle de la régénération épithéliale**

Des études en cours montrent cependant que l'effet du microbiote sur la régénération épithéliale intestinale n'est pas seulement stimulateur, il peut aussi contrôler négativement la prolifération des CSI et des cellules progénitrices. Nous avons identifié une population microbienne spécifique de la crypte colique murine restreinte en densité et diversité que nous avons baptisée « crypt-specific core microbiota » (CSCM). La CSCM est composée — de manière inattendue — de genres microbiens aérobies stricts non fermentatifs tels *Acinetobacter* et *Delftia* [21]. Le diagnostic métataxonomique a été confirmé par isolement et culture [22]. L'endotoxine produite et purifiée d'espèces d'*Acinetobacter* et *Delftia* représentatives, isolées des cryptes coliques murines, a montré un effet cytotoxique portant sur CSI et cellules progénitrices par un mécanisme répondant à la nécroptose [22]. Ces endotoxines de profil faiblement acylé ont aussi la capacité d'accélérer la différenciation de certains lignages épithéliaux, en particulier les cellules mucipares [22]. D'autres travaux ont montré que le butyrate, un des principaux acide gras à chaînes courtes produit par l'activité fermentaire des Firmicutes du microbiote intestinal imposait une réduction de la prolifération des cellules souches de la crypte intestinale murine [23].

### **CONCLUSION**

Le rôle du microbiote dans la régénération épithéliale intestinale est un thème émergent dont les implications médicales demeurent à évaluer au fur et à mesure que se précise le réseau des interactions impliquées [24]. Les mécanismes moléculaires et cellulaires spécifiques demeurent souvent encore imprécis. À titre d'exemple, le rôle de l'activation de la voie MDP-Nod2 dans la cytoprotection des CSI en condition de stress chimique par des drogues cytotoxiques nous fournissent des hypothèses en cours d'évaluation (Lévy *et al.* En préparation). Tout d'abord le stress cytotoxique induit par la Doxorubicine est largement lié à la production massive de radicaux superoxydes puissamment cytotoxiques en réponse aux cassures des brins d'ADN par l'agent intercalant. Nod2 est connu, au-delà de son activité pro-inflammatoire pour sa capacité, en association avec Atg16L1, une protéine de l'autophagie assurant la maturation de l'autophagosome, de stimuler l'autophagie [25], donc une

protection contre le stress oxydant. C'est autour de cette boucle de régulation que se développe notre étude. Sur le versant physiopathologique, ces travaux éclairent possiblement différemment notre conception des maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn. On sait en effet que dans les formes génétiquement définies de cette maladie, ce sont surtout des haplotypes mutés des gènes Nod2 et Atg16-L1 qui sont retrouvés significativement [26]. Dans ces conditions, l'impossibilité de ces sujets de protéger leurs cellules souches intestinales lors d'un stress chimique ou infectieux pourrait fort bien, en l'absence de capacité d'utiliser le MDP comme cytoprotecteur, ralentir considérablement la réparation épithéliale et causer ainsi ce « leaky gut » générateur d'inflammation (Figure 2).

On peut parier que d'autres tissus, en particulier cutané, respiratoire, hématopoïétique, montreront dans le futur un niveau de dépendance au microbiote intestinal et/ou au microbiote spécifique qui les colonise.

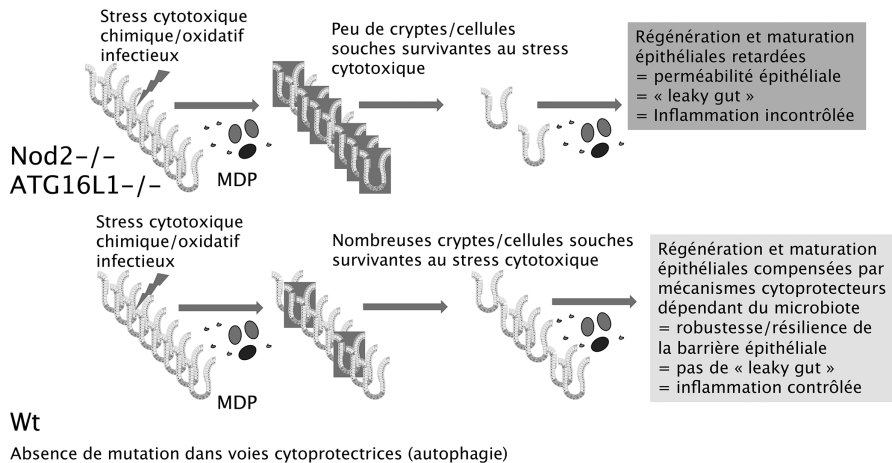


FIG. 2

Rôle possible de l'altération des voies de cytoprotection dépendantes du microbiote dans la physiopathologie de la maladie de Crohn. Dans cette figure est présenté l'effet attendu de mutations dans genes codant des étapes clés de la voie de l'autophagie.

## RÉFÉRENCES

- [1] Qin J, Li R, Raes J, et al. MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010 Mar 4;464:59-65.
- [2] Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearance of the microbiota ? Nat Rev Microbiol. 2009;7:887-94
- [3] Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. FEMS Microbiol Rev. 2008 Aug;32(5):723-35.

- [4] Bhattarai Y, Kashyap PC. Germ-Free mice model for studying host-microbial interaction. *Methods Mol Biol.* 2016;1438:123-35.
- [5] Krishnan S, Alden N, Lee K. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;36:137-45.
- [6] Gareau MG. Microbiota-gut-brain axis and cognitive function. *Adv Exp Med Biol.* 2014 ; 817:357-71
- [7] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009 14;459:262-5
- [8] Romagnolo B. Une relation Paneth entre cellules souches et niche intestinale. *Med Sci (Paris)* 2012;28:1058-60.
- [9] Tan DWM, Barker N. Intestinal stem cells and their defining niche. *Curr Top Dev Biol* 2014;107:77-107.
- [10] Bauer KC, Huus KE, Finlay BB. Microbes and the mind: emerging hallmarks of the gut microbiota-brain axis. *Cell Microbiol* 2016;18:632-44.
- [11] Alam M, Midtvedt T, Uribe A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:445-51.
- [12] Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One* 2011;6:e17996.
- [13] Cheesman SE, Neal JT, Mittge E. Epithelial cell proliferation in the developing zebrafish intestine is regulated by the Wnt pathway and microbial signaling via Myd88. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108 (suppl 1):4570-7.
- [14] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
- [15] Pull SL, Doherty JM, Mills JC, et al. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:99-104.
- [16] Swanson PA, Kumar A, Samarin S, et al. Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:8803-8.
- [17] Girardin SE, Jéhanho M, Mengin-Lecreux D et al. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J Biol Chem.* 2005 Nov 18;280(46):38648-56.
- [18] Nigro G, Rossi R, Commere PH, et al. The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration. *Cell Host Microbe* 2014;15:792-8.
- [19] Zanella G, Goethel A, Rouquier S, et al. The cytosolic microbial receptor Nod2 regulates small intestinal crypt damage and epithelial regeneration following T cell-induced enteropathy. *J Immunol* 2016;197:345-55.
- [20] Stzpourginski I, Nigro G, Jacob JM et al. CD34+ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jan 24;114(4):E506-E513.
- [21] Pédrón T, Mulet C, Dauga C, et al. A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *MBio.* 2012;3. pii: e00116-12.
- [22] Naito T, Mulet C, De Castro C, et al. Lipopolysaccharide from crypt-specific core microbiota modulates the colonic epithelial proliferation-to-differentiation balance. *MBio.* 2017;8. pii: e01680-17.
- [23] Kaiko GE, Ryu SH, Koues OI, et al. The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. *Cell* 2016;165:1708-20.

- [24] Stedman A, Nigro G, Sansonetti PJ. Microbiota-intestinal stem cells dialog:a key element for intestinal regeneration. *Med Sci (Paris)*. 2016 Nov;32:983-990.
- [25] Homer CR, Richmond AL, Rebert NA, et al. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010 Nov;139:1630-41.
- [26] Iida T, Onodera K, Nakase H. Role of autophagy in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23:1944-1953.