



Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : IRSN

Adresse : BP 17 92262 Fontenay aux Roses

Responsable du Laboratoire / Entreprise : Fabien Milliat

Responsable de l'encadrement : SEMONT Alexandra

Téléphone : 0158359533/0608147644

E-mail : alexandra.semont@irsn.fr

Co-encadrant éventuel : GEIGER Mallia

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (2 pages maximum) :

STAGE DE MASTER 2 ANNEE 2021/2022

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

Rôle des tuft cells dans l'efficacité thérapeutique d'une transplantation du microbiote fécal (TMF) sur les altérations radio-induites de l'épithélium colique de rats.

Contexte :

Le cancer est la 2nd cause de décès dans le monde. En France, 30% des cancers diagnostiqués se trouvent dans la zone pelvienne, dont les majoritaires sont les cancers colorectaux, urologiques et gynécologiques. **La radiothérapie externe est l'un des traitements incontournable dans la prise en charge des pathologies cancéreuses pelviennes, 60% des patients en bénéficient.** L'objectif des cliniciens est la recherche d'un compromis optimal entre le contrôle tumoral et les dommages aux tissus sains, situés autour de la tumeur (ratio bénéfice/risque). Néanmoins, l'irradiation des tissus sains de la zone pelvienne entraîne de nombreux effets toxiques au niveau de certains organes comme entre autres le côlon ou le rectum dits « organes radiosensibles ou organes à risque » du fait d'une forte capacité d'autorenouvellement de leur épithélium muqueux.

L'épithélium colorectal est compartimenté fonctionnellement en différentes populations de cellules épithéliales constituant la crypte. Les cellules souches multipotentes quiescentes produisent des cellules progénitrices qui après une amplification transitoire assurent le renouvellement épithélial en se différenciant en cellules épithéliales fonctionnelles majoritairement sécrétrices ; les colonocytes, les cellules à mucus, les cellules enteroendocrines et les cellules en brosse ou « tuft cells ».

La toxicité radio-induite de la muqueuse colorectale entraîne une perte des cellules souches/progénitrices et/ou de leur capacité à renouveler l'épithélium. Cela se traduit par une rupture de l'intégrité fonctionnelle de cet épithélium d'un point de vue « sécrétoire » et « barrière à l'invasion de pathogènes ». Cette perte fonctionnelle tissulaire est une cause directe des complications intestinales aiguës observées chez des patients traités par radiothérapie pelvienne. Des complications gastro-intestinales tardives peuvent également être observées dans 10 à 20% des cas respectivement 10 à 20 ans après leur traitement. **Le nombre croissant de patients développant ces complications ont amené à la définition d'une nouvelle maladie la « Pelvic radiation disease ou PRD ». La complexité**

physiopathologique de la PRD, aujourd'hui encore mal décrite, ainsi que le contexte septique intestinal, limitent l'efficacité des thérapies disponibles.

Notre travail mené au sein de laboratoire de recherche en radiobiologie des expositions médicales (LRMed) s'inscrit dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de réduire les effets toxiques de l'irradiation au niveau de la sphère digestive et ainsi d'optimiser les processus de réparation du côlon.

Des faisceaux de données mettent en évidence une implication du microbiote intestinal dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses et dans leurs effets secondaires toxiques aigus. Tout changement de la diversité/richeesse de ce microbiote (dysbiose) par certains facteurs environnements et/ou associés à des pathologies augmenterait la radiosensibilité de l'intestin et par conséquence la toxicité radio-induite. Des données récentes montrent que certains réseaux spécifiques entre microbiome et métabolome pourraient jouer un rôle important dans la protection de l'intestin exposés à l'irradiation. De plus, des études réalisées sur des souris axéniques recevant une TMF suggèrent que le microbiote non-pathogène aurait la capacité de modifier le nombre et le profil phénotypique des « tuft cells » et donc probablement participerait à leur fonctionnalité.

Les « tuft cells » sont aujourd'hui décrites comme une entité cellulaire distincte des autres cellules épithéliales différenciées, et ce, d'un point de vue anatomique et fonctionnelle. Elles constituent une population cellulaire phénotypiquement hétérogène entre les différents organes du tractus gastro-intestinal mais également au sein d'un même organe, suggérant ainsi des fonctions alternatives dépendantes de leur localisation. En tant que cellules chimio-sensorielles et cellules à fonction sécrétoire, les « tuft cells » orchestrent la détection de tous changements environnementaux de la lumière intestinale (PH, température, hypoxie et contenu microbial) avec la signalisation des cellules de la niche des cellules souches/progénitrices. Les « tuft cells » intestinales en plus d'être régulateurs des cellules de la niche des cellules souches/progénitrices pourraient également en constituer un élément. L'utilisation de souris *Villin-Cre ;DclK1^{flox/flox}*, spécifiquement déficiente en DclK1 (une kinase des protéines à sérines et thréonines) au niveau des cellules épithéliales de l'intestin montre l'implication de cette enzyme dans le processus de régénération de l'épithélium de l'intestin grêle après une irradiation corps entier aux doses de 12 ou 13 Gy. DclK1 majoritairement produit par les « tuft cells » dans l'épithélium aurait un effet radio-protecteur des cellules souches/progénitrices. Ces études suggèrent qu'en l'absence d'expression de DclK1 par les « tuft cells », les cellules souches/progénitrices survivant à l'irradiation perdraient leur capacité à assurer la réparation épithéliale et montrent un impact de la délétion de DclK1 sur la survie de l'animal. Ces études ne permettent néanmoins pas de comprendre, l'impact direct de l'irradiation sur les « tuft cells » DclK1+ elles-mêmes et l'impact d'une dysbiose radio-induite sur leur fonction de niche. Rien n'est connu sur l'implication des « tuft cells » au niveau du côlon en réponse à l'irradiation.

Objectif du projet de Master 2:

L'objectif de ce projet sera d'étudier la régulation et l'implication des tuft cells dans l'efficacité thérapeutique d'une TMF sur le maintien après irradiation fractionnée colorectale de l'intégrité de la barrière épithéliale colique de rat.

Déroulement du projet

1. L'étudiante participera dans un premier temps à la caractérisation du modèle d'irradiation par une analyse de la dynamique temporelle de la dysbiose du microbiote fécal. Ce travail a déjà été initié au laboratoire et s'effectuera en collaboration avec Mathieu Almeida de MetaGenoPolis (MGP de l'INRAe de Jouy en Josas). Il s'agira d'analyser le microbiote fécal en séquençant le génome entier par shotgun. Il permettra d'identifier le temps pour lequel une dysbiose s'est installée après irradiation. Dans ce M2 la TMF sera initiée à ce temps. Notre hypothèse serait qu'en limitant la dysbiose radio-induite, les dommages de la zone colorectale pourraient être également réduits.

2. Régulation *in vivo* des tuft cells :

L'efficacité de la TMF sera évaluée *in vivo* sur la capacité d'auto-renouvellement et de régénération de l'épithélium colique. Les tuft cells seront évaluées en tant que niche immunitaire des cellules souches/progénitrices. Une étude immuno-histologique sera réalisée à partir de coupes de côlon. L'utilisation d'anticorps Sox9, Bmi1, DclK1, IL25, CAT (respectivement marqueurs des cellules souches/progénitrices et « tuft cells ») associée soit à un anticorps PCNA (marqueur de prolifération) soit au marquage TUNEL (évaluation de l'apoptose) permettra d'analyser l'intégrité du compartiment cellules souches/progénitrices et des « tuft cells » au sein de l'épithélium colique. Le nombre de « tuft cells » DclK1+/IL25+ ou DclK1+/CAT+ apoptotiques sera évalué. La position des cellules DclK1+/IL25+ ou DclK1+/CAT+ par rapport aux cellules souches progénitrices Sox9+ sera également identifiée.

3. Régulation *in vitro* des tuft cells :

L'implication du microbiote et des tuft cells dans l'efficacité de la TMF sera abordée *in vitro* sur des organoïdes de côlon de souris mis en place au laboratoire. Un organoïde est une structure tridimensionnelle

qui reproduit *in vitro* la micro-anatomie d'un organe (mini-organe). Dans notre cas, l'organoïde est organisé en cryptes épithéliales. La « xéno-transplantation » du microbiote fécal comme la TMF de rats sur des souris axéniques, est classiquement réalisée pour démontrer l'implication physiologique du microbiote et d'une dysbiose dans une pathologie. Il n'y a donc pas de limites inter-espèces. Dans l'expérience 1, des organoïdes cultivés ou pas dans un milieu permettant la survie et la sur-expression à long terme des tuft cells (présence de cytokines IL13 et/ou IL4 recombinantes et/ou agonistes cholinergiques) seront mis en présence d'eau fécale provenant de rats contrôles, irradiés ou irradiés+TMF. Le nombre et la taille des organoïdes, seront évalués jusqu'à 7 jours de culture en utilisant le système Incucyte. Un marquage immunohistologique des cellules souches/progénitrices et de leur prolifération (Sox9, Bmi1) ainsi que des tuft cells (Dclk1, IL25 et CAT) sera réalisé. Dans une deuxième expérience, un inhibiteur de l'activité kinase des protéines à sérines et thréonines (inhibition de l'activité Dclk1) sera ajouté dans le milieu de culture afin d'identifier le rôle exact des tuft cells Dclk1+ et du Dclk1 lui-même dans le développement des organoïdes au cours du temps (même procédure expérimentale que dans l'expérience 1).

Les résultats du M2, en complément des analyses réalisées sur l'inflammation et la dysbiose (thèse 2019-2022, Mallia GEIGER) pourront permettre de proposer un sujet de thèse sur les mécanismes impliqués dans l'efficacité de la TMF sur les atteintes de l'épithélium colique avec un focus plus particulier sur la symbiose entre hôte et bactéries.