

Identification des progéniteurs de l'épithélium intestinal fœtal

Marie-Isabelle Garcia, Gilbert Vassart

> L'épithélium intestinal est l'un des tissus subissant le plus fort taux de renouvellement chez les mammifères adultes. Cette capacité d'autorégénération constante est assurée par des cellules souches adultes qui, tout en se perpétuant à long terme, se différencient en l'un des cinq types cellulaires de l'épithélium : les entérocytes impliqués dans l'absorption des nutriments, les cellules caliciformes produisant le mucus intestinal, les cellules entéroendocrines produisant des hormones digestives et les cellules *tuft* dont la fonction précise reste à déterminer dans les villosités, tandis que les cellules de Paneth, engagées dans l'immunité antimicrobienne, sont situées au fond des cryptes de Lieberkühn au contact des cellules souches [1].

Les cellules souches adultes : un pool complexe

Les recherches menées au cours des dernières années ont permis d'identifier les cellules souches au moyen de marqueurs moléculaires spécifiques et d'étudier leur fonction [1, 2]. Les cellules souches nommées *crypt base columnar cells* (CBC) assurent le renouvellement en condition d'homéostasie. Elles sont caractérisées par un taux de prolifération élevé et par l'expression du récepteur Lgr5 (*leucine-rich repeat G protein-coupled receptor 5*) [3]. En cas de dommages nécessitant une régénération, des cellules souches cyclant peu en conditions normales, situées en position « +4 » dans les cryptes, aussi désignées *label-retaining cells*, peuvent être recrutées afin d'assurer le renouvellement de l'épithélium. En réalité, il

existe une grande plasticité cellulaire puisque ces deux compartiments de cellules souches sont capables d'interconversion. De plus, des cellules déjà engagées dans la voie de la différenciation, sont également capables de dédifférenciation vers les CBC et peuvent être, de ce fait, considérées comme des cellules souches additionnelles de réserve [4]. Malgré ces avancées importantes dans l'identification et les fonctions des cellules souches adultes, leur origine au cours du développement embryonnaire reste encore peu connue. Cette question est d'autant plus intéressante que l'architecture de l'épithélium intestinal subit des modifications majeures au cours de la période prénatale avant de se présenter selon un axe cryptovillositaire adulte. En effet, les villosités intestinales n'apparaissent qu'autour du jour embryonnaire E15 chez la souris (équivalent à la 9^e semaine de gestation chez l'homme) au cours d'un processus associé à l'acquisition de l'identité (*cytodifférenciation*) des différents types cellulaires de l'épithélium. Auparavant (E14 chez la souris), l'intestin se présente comme un tube constitué d'un épithélium simple pseudostratifié [5]. Il était donc intéressant d'identifier les cellules fœtales impliquées dans la villogénèse, et d'établir leur lien potentiel avec les cellules souches adultes de type CBC.

Les cellules progénitrices fœtales

Des sphéroïdes cultivés *ex vivo*

Cette question a été abordée en utilisant le système *ex vivo* développé pour la culture tridimensionnelle de cellules souches intestinales adultes

Institut de recherche interdisciplinaire en biologie humaine et moléculaire (IRIBHM), Faculté de médecine, Université libre de Bruxelles, route de Lennik 808, 1070 Bruxelles, Belgique.

mgarcia@ulb.ac.be

gvassart@ulb.ac.be

sous forme d'organoïdes, aussi décrits comme des « mini-intestins adultes » [6]. Les intestins de souris ont été prélevés à différents stades du développement fœtal et postnatal, puis cultivés *ex vivo* [7]. Nous avons constaté que la culture d'intestins à E14 génère, non pas des organoïdes, mais des sphéroïdes constitués de cellules épithéliales polarisées monostratifiées d'origine intestinale, capables de renouvellement à long terme. La proportion des sphéroïdes produits en culture décroît au cours du développement, ces derniers étant progressivement remplacés par des organoïdes, tels qu'on les obtient par la culture de cellules souches adultes. Ceci indique que les cellules générant les sphéroïdes sont le reflet d'un stade particulier du développement de l'épithélium intestinal fœtal.

Un transcriptome différent de celui des CBC

Le profil d'expression génique de ces sphéroïdes fœtaux diffère de celui des organoïdes par l'absence d'expression de marqueurs de différenciation des lignées cellulaires de l'épithélium adulte et par des niveaux faibles, voire indétectables, des marqueurs de CBC, tels que le récepteur Lgr5. L'analyse de cultures d'intestins provenant de souris invalidées pour le récepteur Lgr5 a montré que ce marqueur n'est pas requis pour la croissance des sphéroïdes, au contraire du récepteur paralogue Lgr4 qui, lui, est apparu essentiel pour leur génération [7]. Bien que radicalement différents des CBC, les sphéroïdes fœtaux sont caractérisés par l'expression de gènes décrits comme marqueurs de cellules



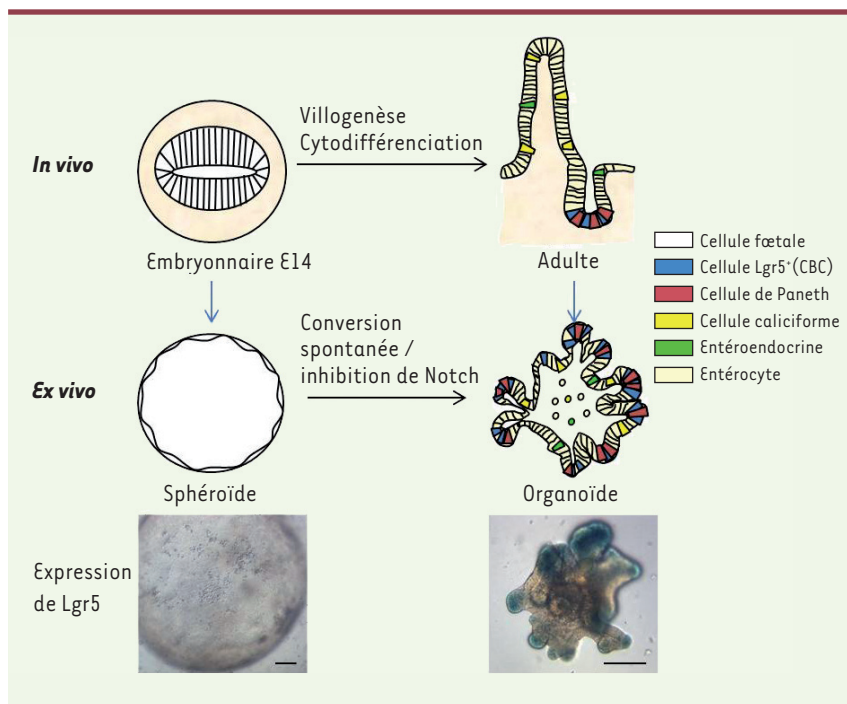


Figure 1. Représentation schématique de l'épithélium intestinal murin aux stades embryonnaire (E14) et adulte. Les cellules progénitrices fœtales et souches adultes Lgr5⁺ génèrent respectivement des sphéroïdes et des organoïdes lorsqu'elles sont cultivées *ex vivo*. L'expression de Lgr5, marqueur de cellules souches adultes, y est visualisée par mesure de l'activité β -galactosidase (cellules bleues) à partir de la lignée de souris transgénique *Lgr5-LacZ*. Échelle : 200 μ m.

souches/progénitrices ou impliqués dans la régénération cellulaire dans certains tissus. La pertinence *in vivo* des marqueurs de sphéroïdes (cultivés *ex vivo*) a été ensuite confirmée en analysant leur expression sur de l'épithélium intestinal d'embryons de souris. Parmi ces marqueurs figurent le *tumor-associated calcium signal transducer 2* (*Trop2/Tacstd2*), proposé comme marqueur diagnostique de cancer colorectal, et la connexine 43, aussi nommée *gap junction protein 1* (*Cnx43/Gja1*) car impliquée dans les communications intercellulaires [8, 9]. Au stade précédant la phase de villogenèse (E14), ces deux molécules apparaissent fortement exprimées dans l'épithélium, tandis que leur expression disparaît progressivement après le début de la cytodifférenciation [7]. Des expériences complémentaires de traçage cellulaire ont été réalisées à l'aide de souris transgéniques *Cnx43-CreER/Rosa26R* exprimant

une Cre recombinase placée sous le contrôle du promoteur du gène *Cnx43* et activable de façon conditionnelle par le tamoxifène. Les données obtenues ont montré que les cellules exprimant la *Cnx43* contribuent essentiellement à la villogenèse fœtale. Au contraire, des expériences similaires réalisées avec des souris transgéniques *Lgr5-CreERT2/Rosa26R* ont confirmé le rôle majeur des cellules exprimant le récepteur Lgr5 dans la villogenèse adulte et postnatale, mais une contribution mineure à la villogenèse fœtale [7]. Ces observations ont permis de conclure que l'épithélium intestinal se développe en deux phases successives, l'une fœtale transitoire et l'autre adulte définitive, et que ces phases dépendent de deux types différents de cellules souches.

Conversion des sphéroïdes en organoïdes

Afin d'établir s'il existe un lien possible entre ces deux types de cellules

impliquées dans les villogenèses fœtale et adulte, la conversion de sphéroïdes fœtaux en organoïdes adultes a été recherchée *ex vivo*. Une conversion spontanée a pu être constatée, conduisant à l'apparition de CBC dans les organoïdes néoformés, mais elle est peu active [7]. Ce taux de conversion augmente si les cultures sont traitées avec des agents modulant négativement la cascade de signalisation Notch, voie bien connue pour contrôler la différenciation des cellules souches intestinales [7]. Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans la transition de sphéroïde à organoïde ne soient pas encore élucidés, ces données indiquent toutefois que les cellules fœtales ont la capacité intrinsèque de se convertir en cellules souches adultes et suggèrent l'existence d'un processus similaire *in vivo*.

Dans un article paru simultanément au nôtre, Fordham *et al.* ont aussi rapporté l'existence de cellules fœtales murines et humaines (au stage gestationnel de 10 semaines) de l'épithélium intestinal capables de générer des sphéroïdes *ex vivo* [10]. Dans une expérience destinée à établir la preuve de concept, les cellules de sphéroïdes fœtaux murins ont pu être utilisées comme source de greffe dans un modèle de colite induite dans des souris adultes immunodéficientes ; elles se montrent capables de générer des cellules différenciées dans le tissu hôte [10].

L'identification de cellules progénitrices à l'origine de l'épithélium fœtal intestinal et en amont des cellules souches adultes laisse penser que des types de cellules similaires pourraient exister dans d'autres organes du tube digestif embryonnaire. L'isolement et la caractérisation de ces populations cellulaires feront certainement l'objet de recherches futures. \diamond

identification of progenitors of the foetal intestinal epithelium

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.



RÉFÉRENCES

- Joubert D, Hollande F, Jay P, Legraverend C. Les cellules souches intestinales, 30 ans d'une histoire exemplaire. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 441-4.
- Romagnolo B. Une relation Paneth entre cellules souches et niche intestinale. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 1058-60
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007 ; 449 : 1003-7.
- Buczacki SJ, Zecchini HI, Nicholson AM, et al. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 2013 ; 495 : 65-9.
- Spence JR, Lauf R, Shroyer NF. Vertebrate intestinal endoderm development. *Dev Dyn* 2011 ; 240 : 501-20.
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009 ; 459 : 262-5.
- Mustata RC, Vasile G, Fernandez-Vallone V, et al. Identification of Lgr5-independent spheroid-generating progenitors of the mouse fetal intestinal epithelium. *Cell Rep* 2013 ; 5 : 421-32.
- Trerotola M, Cantanelli P, Guerra E, et al. Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth. *Oncogene* 2013 ; 32 : 222-33.
- Kar R, Batra N, Riquelme MA, Jiang JX. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys* 2012 ; 524 : 2-15.
- Fordham RP, Yui S, Hannan NR. Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell* 2013 ; 13 : 734-44.

NOUVELLE

Les tumeurs dormantes prises au piège de la récurrence

Nicolas Boisgerault, Richard G. Vile

Mayo Clinic, Department of Molecular Medicine,
200 First Street SW, Guggenheim 18, Rochester, MN, 55905,
États-Unis.

boisgerault.nicolas@mayo.edu

vile.richard@mayo.edu

Le suivi des tumeurs dormantes et la détection précoce des récurrences tumorales constituent des défis majeurs en cancérologie. La phase de dormance est la période durant laquelle certaines cellules malignes ayant échappé au traitement de la tumeur primaire demeurent au site tumoral à l'état latent [1]. Chez les patients, cette période peut s'étendre de plusieurs mois à plusieurs années et précède souvent l'émergence de récurrences agressives, conséquences de profondes modifications phénotypiques acquises sous la pression de sélection du microenvironnement, des cellules immunitaires et des traitements antitumoraux. Les mécanismes qui président à la réactivation des tumeurs dormantes sont largement méconnus et il demeure extrêmement difficile de prédire l'émergence de récurrences ou leur sensibilité aux traitements disponibles.

Afin d'étudier les mécanismes tumoraux impliqués dans ces différents stades de la progression tumorale, nous avons récemment développé différents modèles murins de mélanome et d'adénocarcinome de la prostate. Dans ces modèles, les cellules tumorales sont traitées de façon sous-optimale par immunothé-

rapie, virothérapie ou chimiothérapie afin de provoquer une régression significative de la tumeur primaire tout en permettant la survie de quelques cellules à l'état latent, puis l'émergence de récurrences. Dans un travail précédent, nous avons ainsi identifié une sous-population de cellules tumorales, responsables de l'initiation du processus de récurrence, qui présentent des propriétés plastiques leur permettant d'ajuster leur phénotype en fonction des pressions de l'environnement [2]. Ces cellules se caractérisent notamment par une surexpression transitoire de la topoisomérase-II α qui peut être ciblée de façon spécifique par l'utilisation de doxorubicine afin de prévenir l'émergence de récurrences.

Détection précoce des récurrences tumorales

Notre dernière étude visait à caractériser plus précisément les tumeurs dormantes et à déterminer si les récurrences pouvaient être détectées à un stade précoce et avant tout autre signe clinique [3]. Des travaux précédents [4], en particulier sur la transition angiogénique [5, 6] (→), suggéraient

notamment que certaines cytokines intervenaient dans ces mécanismes. Nous avons effectivement découvert que l'apparition de récurrences chez l'animal était précédée de la sécrétion transitoire de *vascular endothelial growth factor* (Vegf) et d'interleukine-6 (IL-6), qui pouvaient être détectés de façon systématique dans le sérum. En combinant l'utilisation d'un plasmide contenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *Vegf* et l'imagerie de bioluminescence *in vivo*, l'apparition de récurrences pouvait ainsi être anticipée jusqu'à douze jours avant que la tumeur ne devienne décelable par les techniques classiques.

Les sécrétions de Vegf et d'IL-6 sont liées à l'activation d'une réponse immunitaire innée qui reconnaît la reprise soudaine de la prolifération tumorale. Afin d'échapper à cette réponse immune puis d'évoluer vers une récurrence de taille plus importante, les cellules malignes doivent alors modifier leur phénotype en profondeur. Nous avons ainsi montré qu'au cours du processus de récurrence, ces cellules acquièrent une forte insensibilité aux effecteurs innés, tout en étant reconnues plus efficacement par

(→) Voir *m/s* n° 12, décembre 2012, page 1069