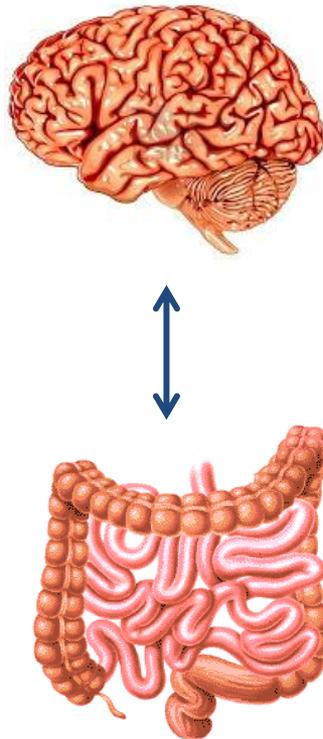


Master Nutrition et Sécurité des Aliments

**Détection des nutriments par l'axe intestin-cerveau
« the gut feeling »**



**Communication bi-directionnelle
intestin-cerveau**

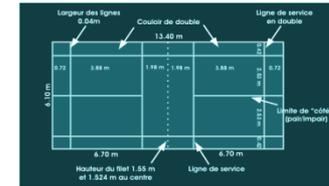
Le tractus digestif : un système remarquable en physiologie

« entérocentrisme »

Surface d'échange
la plus grande de l'organisme :
(vs 2 m² pour la peau)



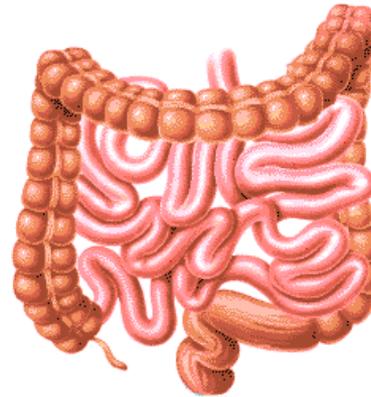
200 m²



80 m²

Système endocrine
le plus vaste de
l'organisme (cellules
entéroendocrines)

Système immunitaire
le plus important en taille
(Gut Associated Lymphoid
Tissue)



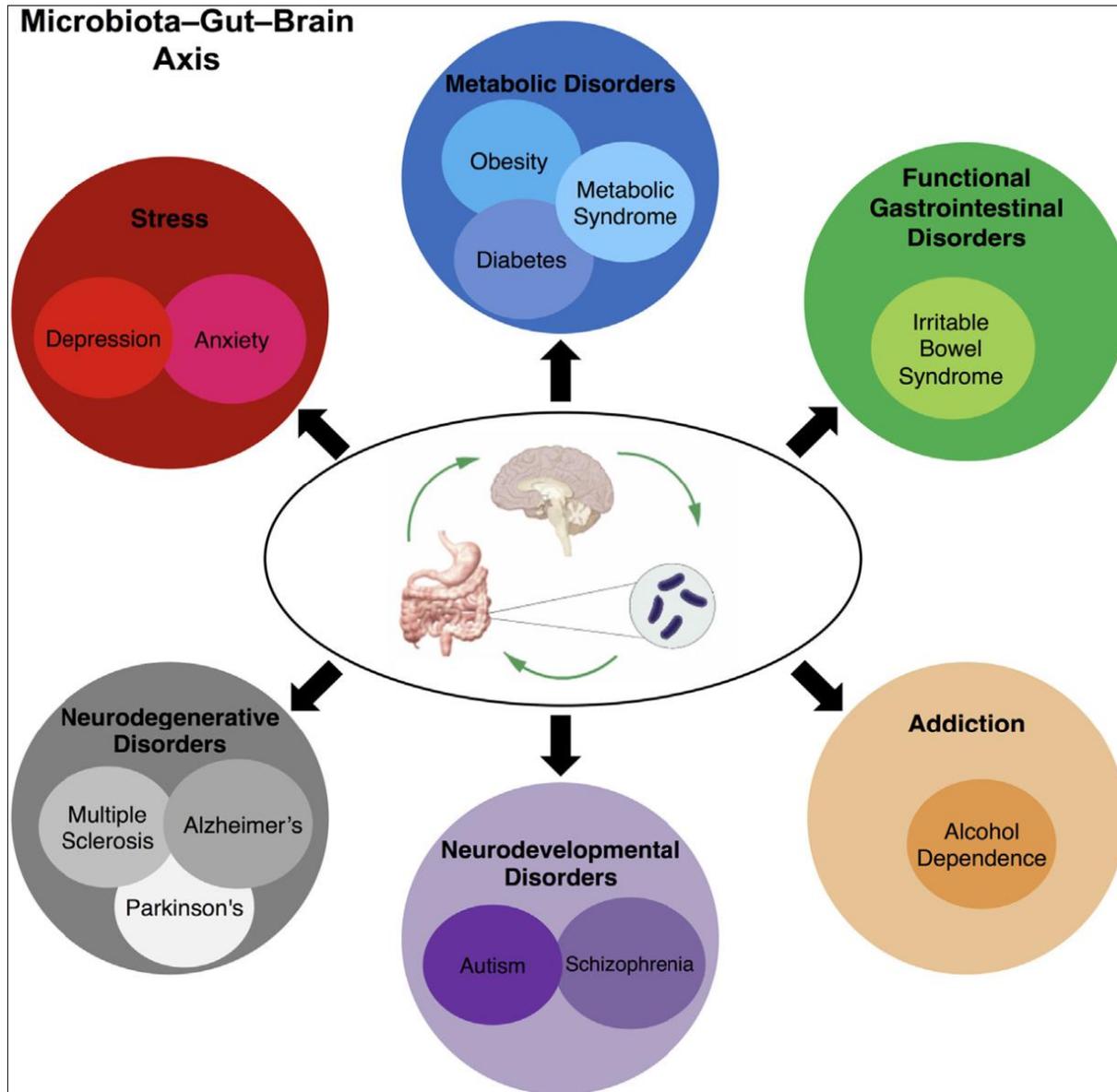
Système nerveux
- Système nerveux central :
10¹² neurones
- Système nerveux
entérique : 10⁸ neurones et
10¹² synapses

Microbiote

Homme = Holobionte

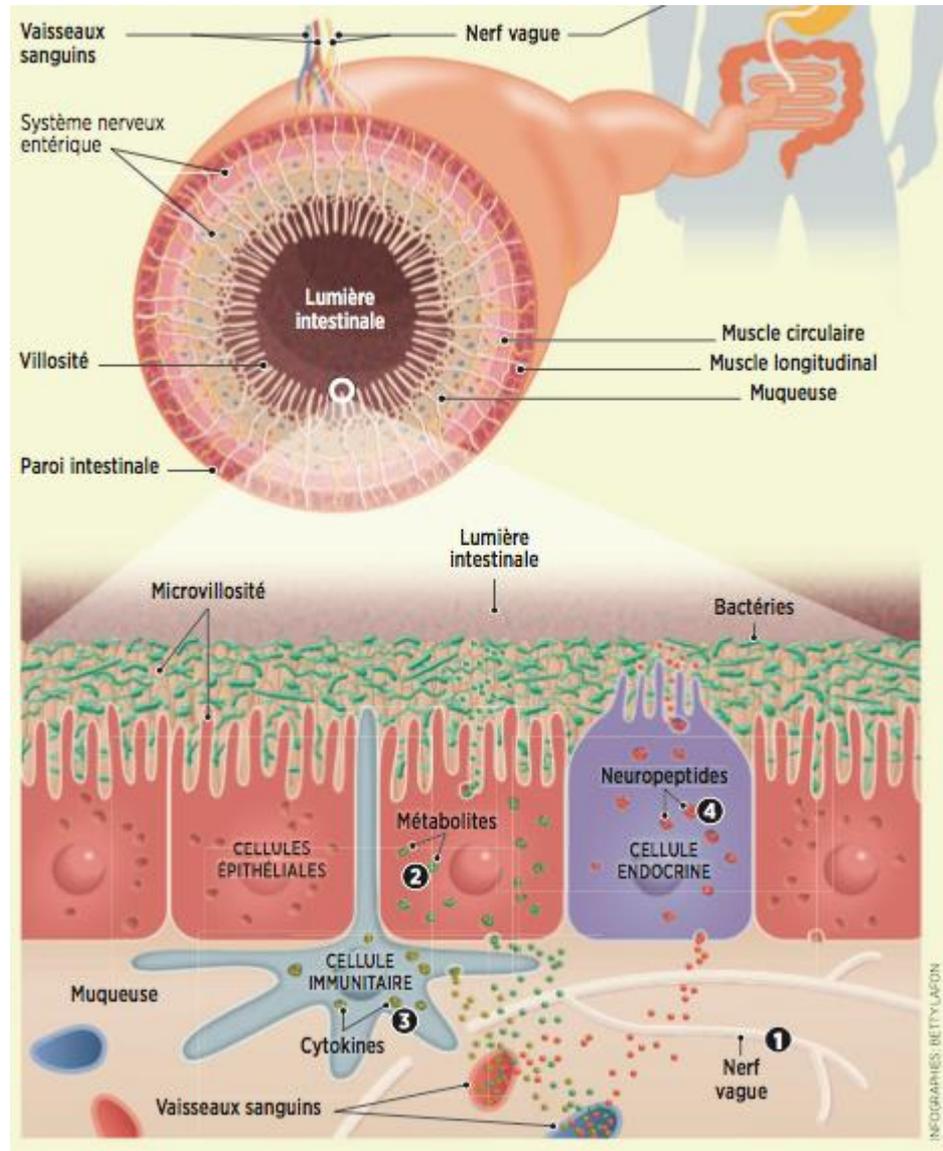
- Microbiote : 10¹⁴ « germes », 1000 espèces bactériennes, 1-2 kg
- 3.10⁶ gènes dans le microbiome humain vs 23000 gènes chez l'homme

Dysfonctions axe gut-brain



Axe gut-brain: quels acteurs?

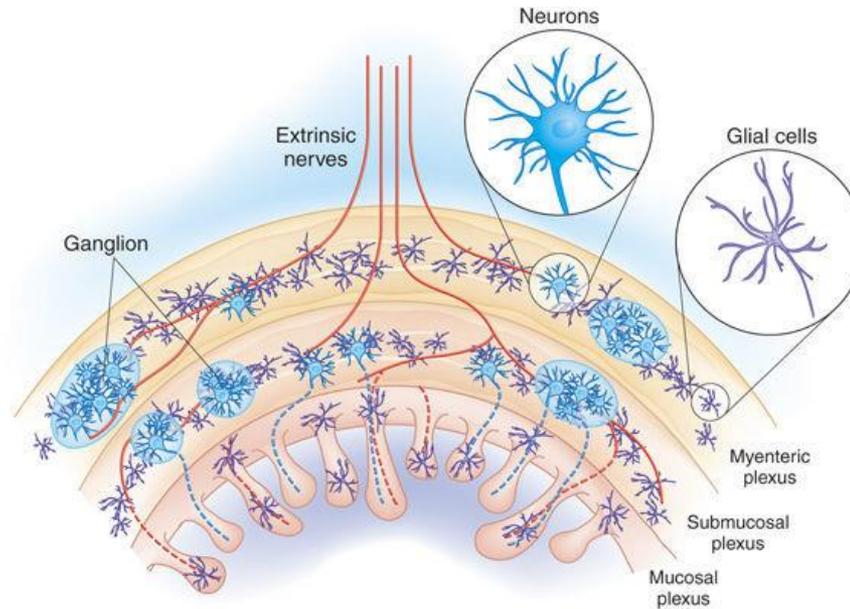
Intestin: muscles, muqueuse (replis) , système nerveux, vaisseaux sanguins



1. Système nerveux entérique

Considéré comme le « deuxième cerveau » (Gershon, 2002)

- Fonctionne de façon autonome: neurones sensitifs, moteurs et interneurones



- Coordonne les fonctions intestinales
- Communication avec le cerveau:
 - neurotransmetteurs: Ach, NA, Adr, GABA...
 - neuropeptides: substance P, neuropeptide Y et opioïdes

2. Les relais nerveux extrinsèques vers le cerveau

Branches parasympathiques du système nerveux autonome : afférences vagales et spinales

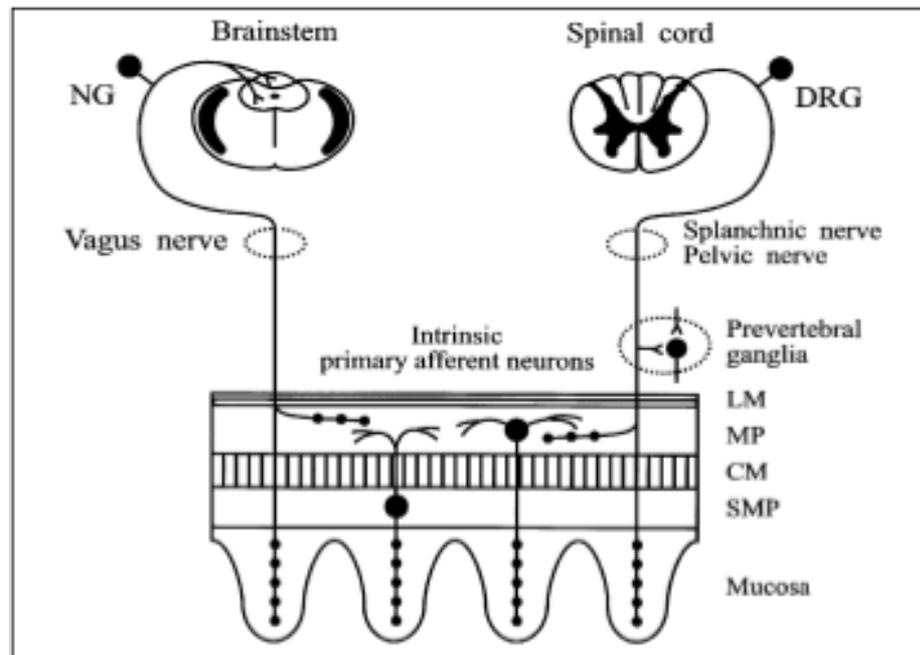
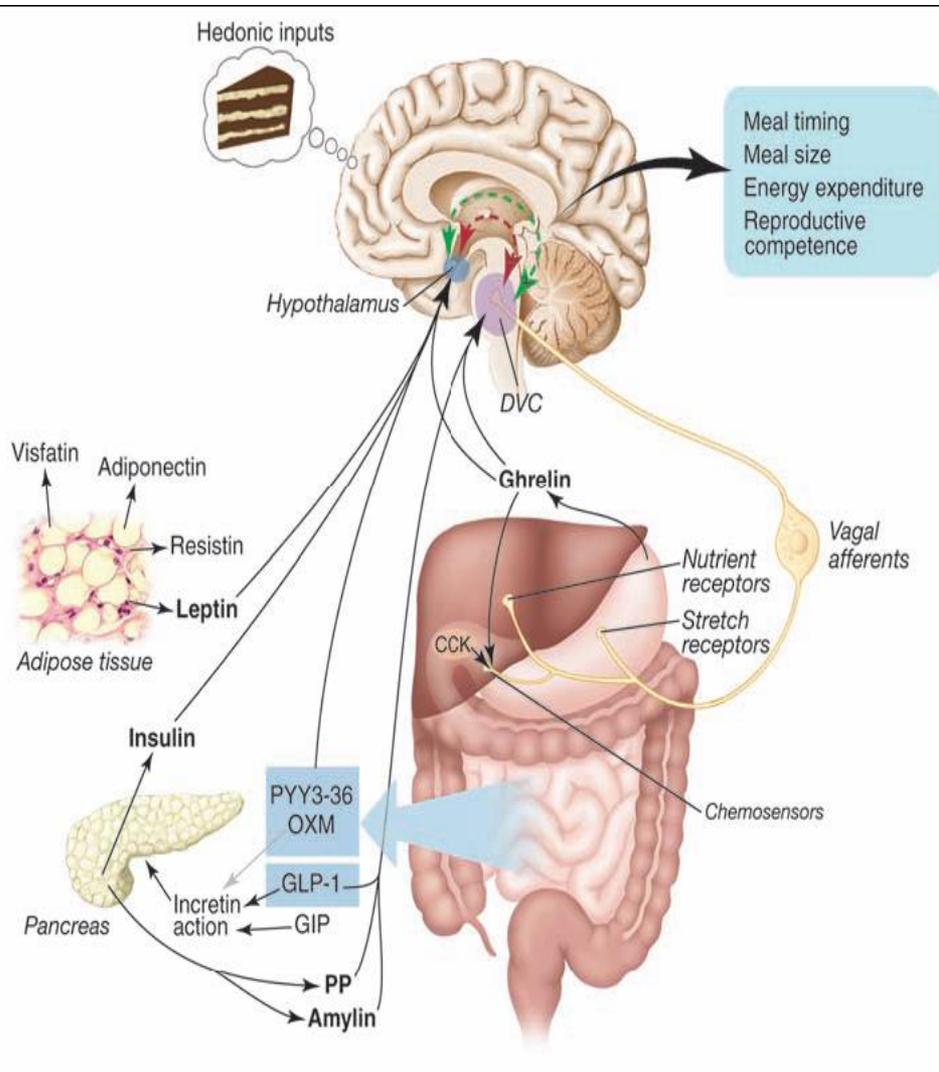


Fig. 1. Innervation of the GI tract by intrinsic and extrinsic sensory neurons. The two populations of intrinsic primary afferent neurons originate in the submucosal plexus (SMP) and myenteric plexus (MP), respectively. The two populations of extrinsic sensory neurons are vagal afferents originating from the nodose ganglia (NG) and spinal afferents originating from the dorsal root ganglia (DRG). CM, circular muscle; LM, longitudinal muscle.

Holzer, 2001

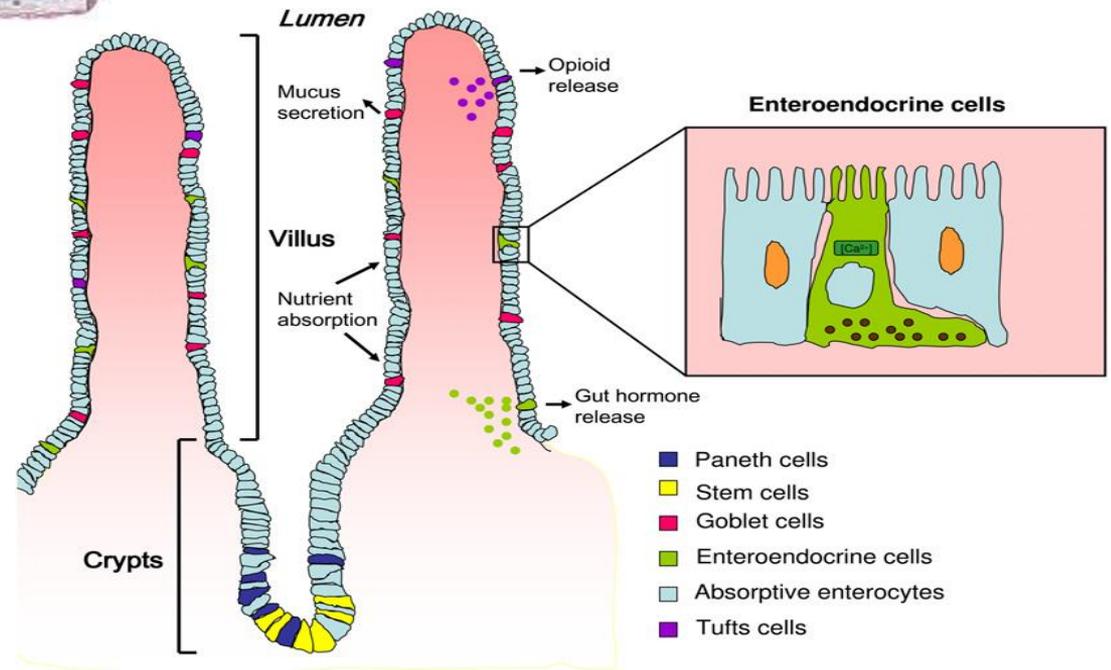
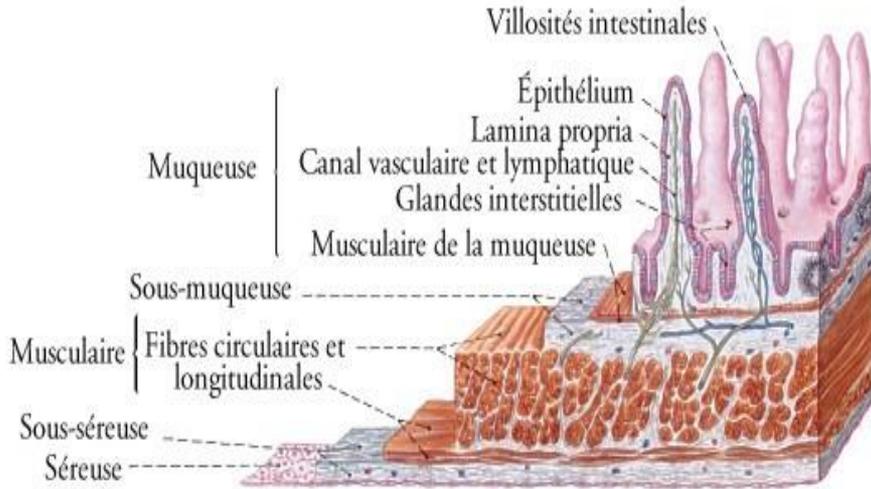
Voie vagale: Communication réciproque intestin/cerveau

Régulation de la PA à court-terme (satiété) et homéostasie E

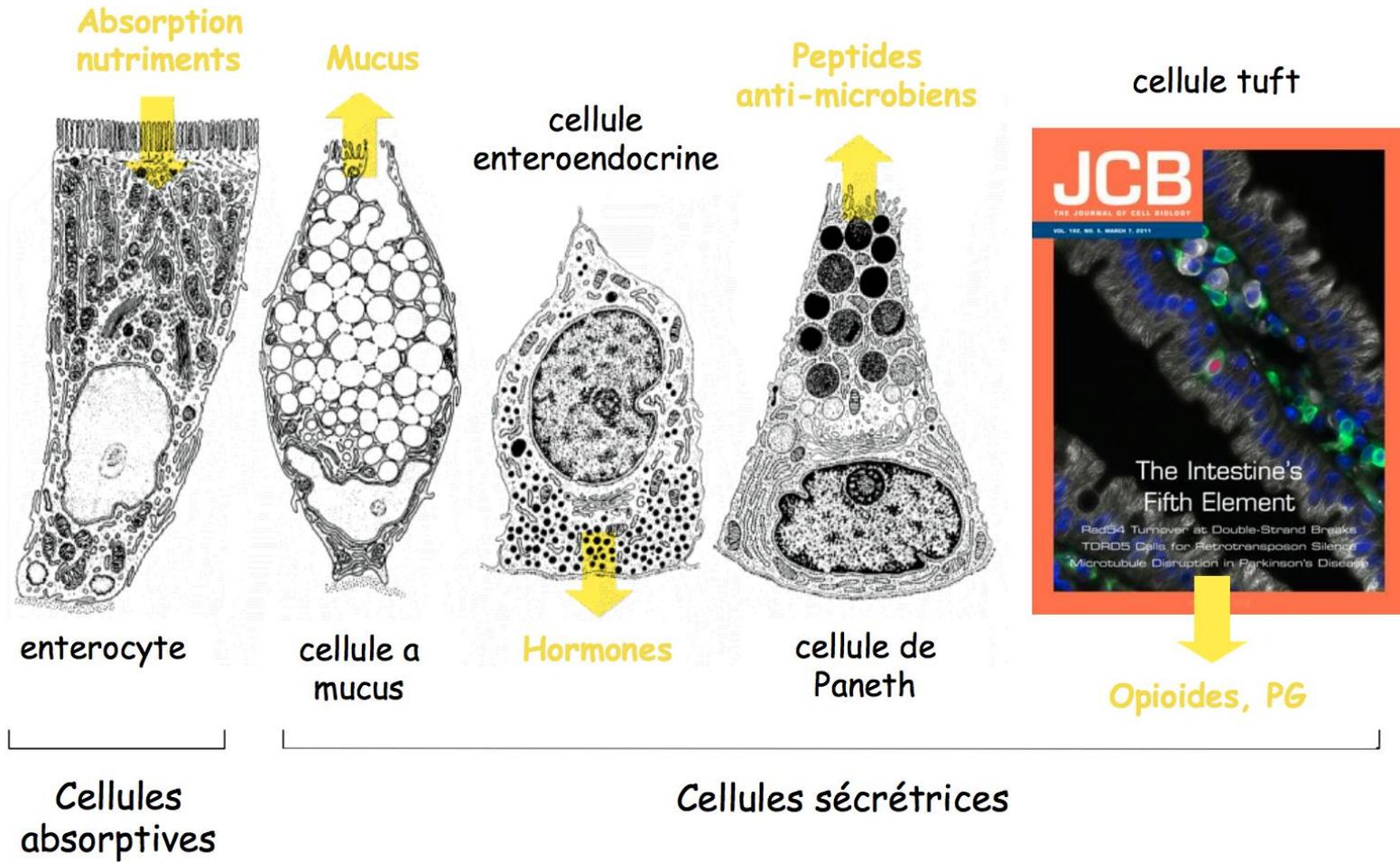


- ### Infos sur la disponibilité en
- aliments ingestibles (SNC)
 - aliments digestibles
 - énergie/métabolites circulants (voie sanguine)
 - énergie stockée (TA, foie)

3. Le système endocrine



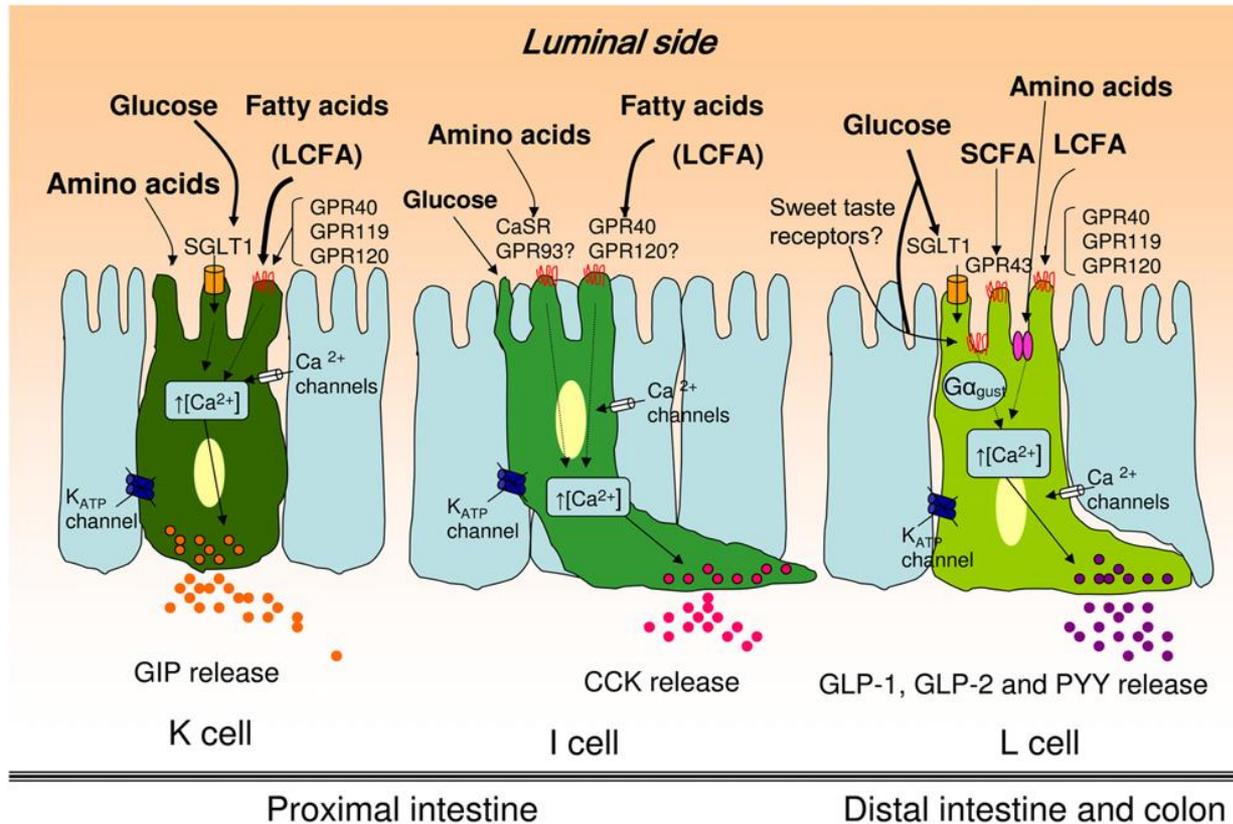
Les fonctions des cellules épithéliales intestinales



3. Le système endocrine

CEE: Gut chemosensing

Les récepteurs aux « nutriments »



Moran-Ramos et al. 2012

Représentation schématique du « sensing » nutritionnel de 3 sous-types cellulaires entéroendocrines

3. Le système endocrine

Les cellules entéro-endocrines: cellules sensorielles du TD

CEE sécrètent des « hormones » régulatrices
(peptides gastro-intestinaux)

Type de cellules	Sécrétion	Pancréas	Estomac	Intestin	Côlon	Rôle dans la prise alimentaire
B	insuline	+				
A	glucagon	+				
I	CCK			+ duo-jéju		↓
K	GIP			+ duo-jéju		↓
L	GLP-1 et PYY			+ Jéju iléon	+	↓
EC	Sérotonine		+	+	+	
ECL	Histamine		+			
A-like (X)	ghréline		+	+ duo		↑

3. Le système endocrine

Effet des peptides/hormones sur cerveau:

- prise alimentaire
- homéostasie E
- rythmes circadiens
- activité sexuelle
- éveil et anxiété

Exemple 1

Sérotonine (5-HT) : amine (cellules EC et SNE) = neurotransmetteur

Tube digestif : 95% de la 5-HT produite

Régule les sécrétions GI, la motricité et la perception de la douleur + Régulation humeur et cognition.

Exemple 2

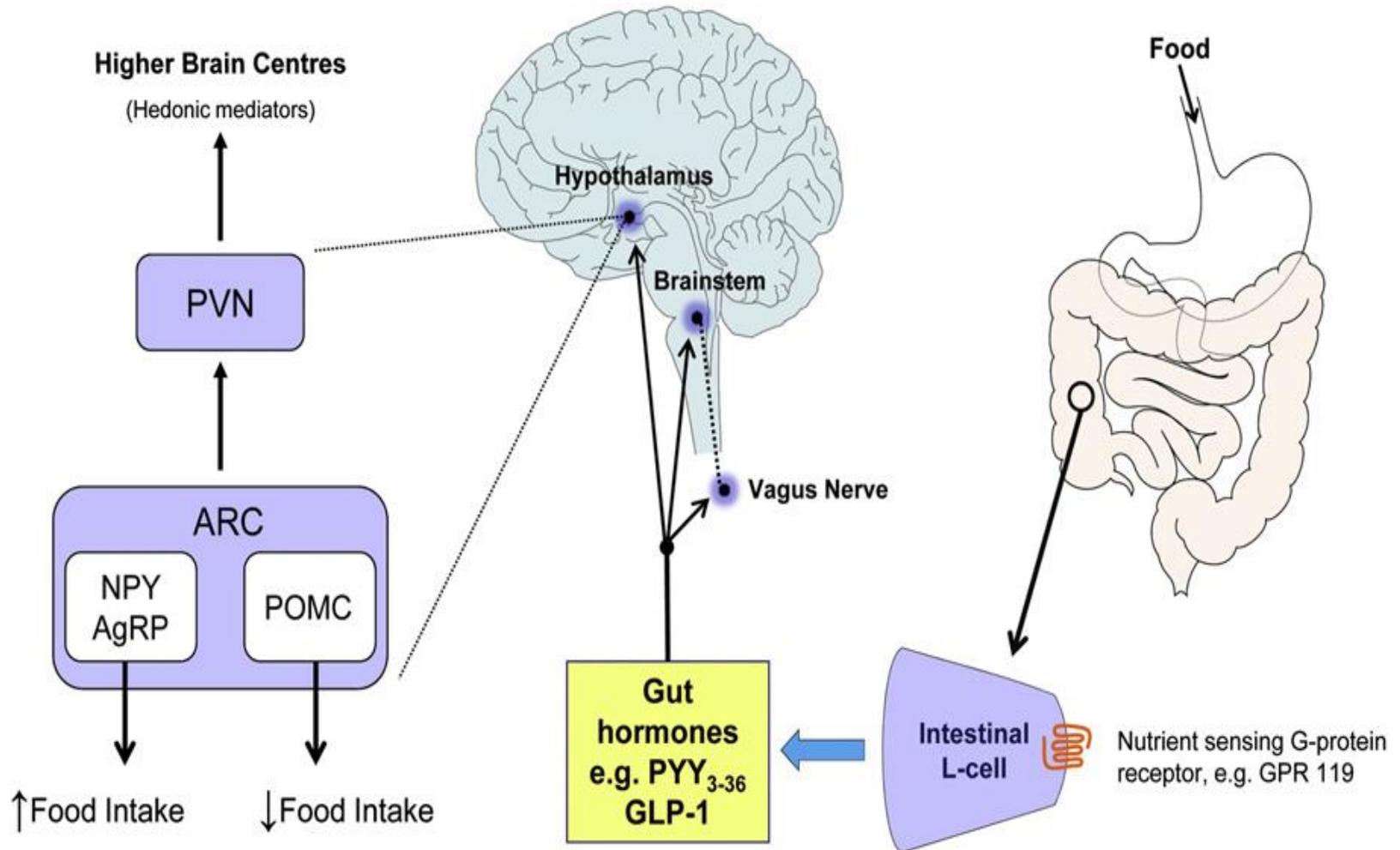
Ghréline : peptide (cellules A/X gastriques), stimule la prise alimentaire

Réponse HPA au stress : réduirait les comportements de type anxieux et dépressifs (Schellekens et al. 2012)

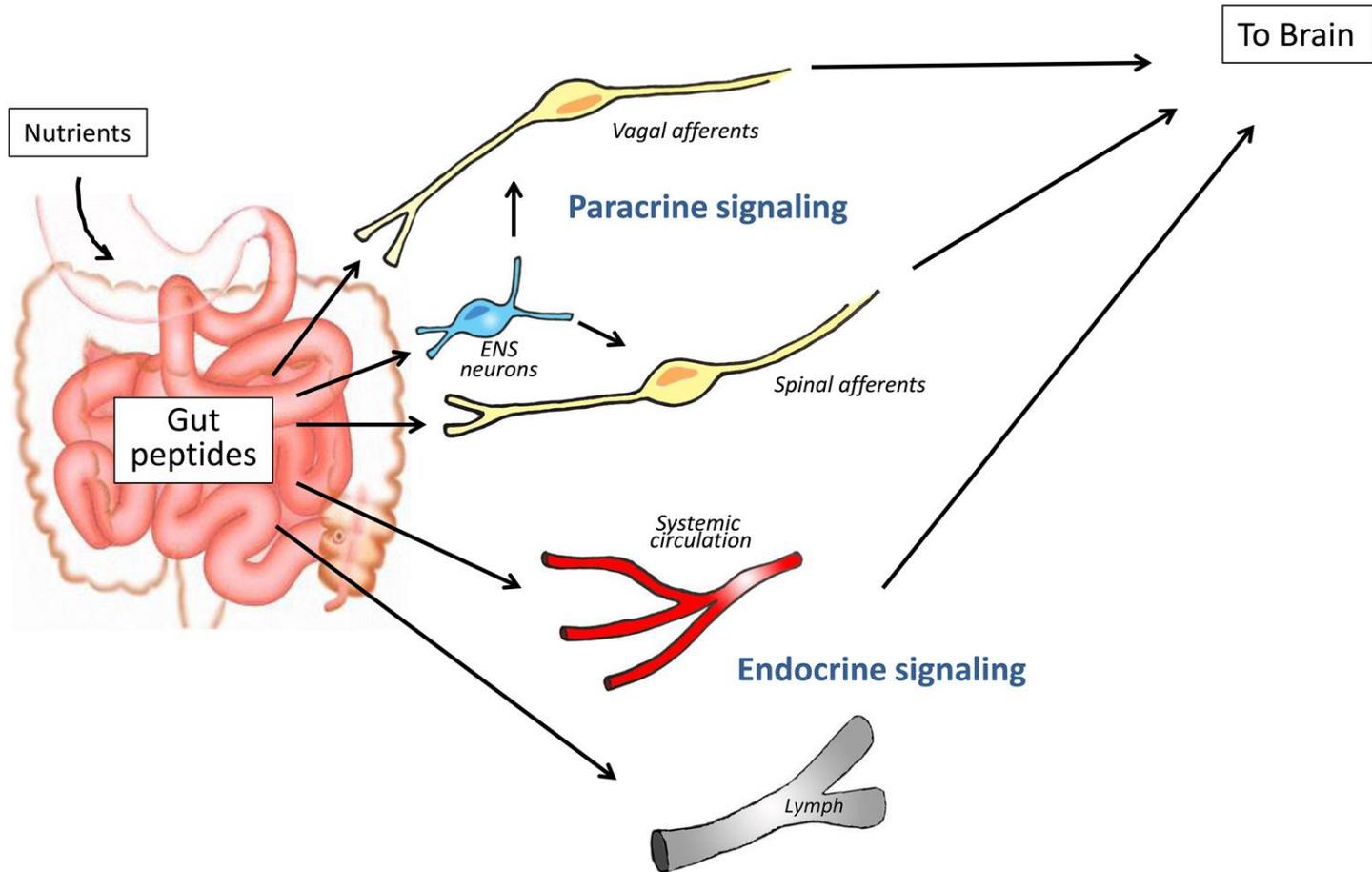
3. Le système endocrine

Exemple 3

Sécrétion de GLP-1 et de PYY par les cellules L sur la régulation de la prise alimentaire

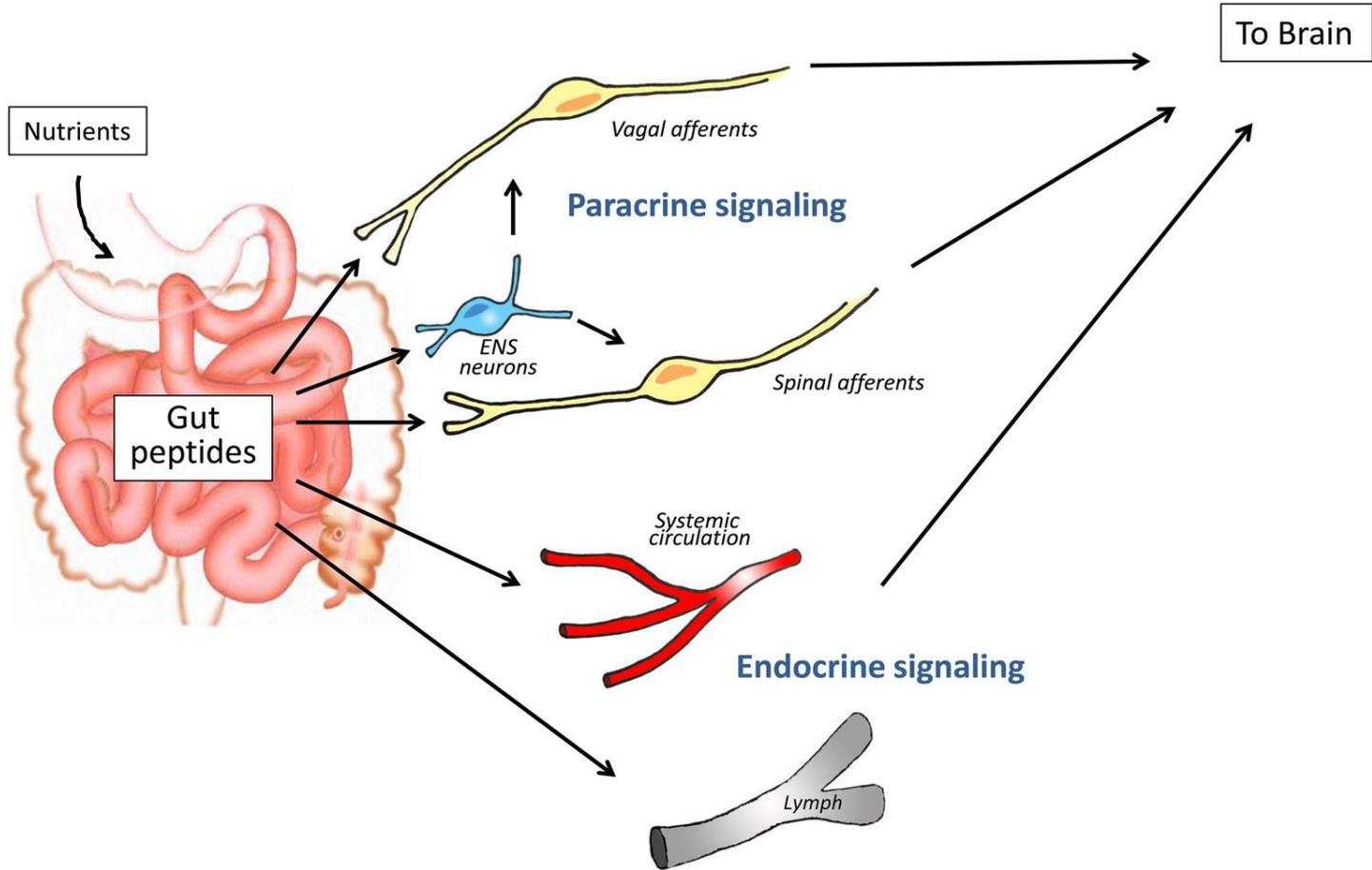


3. Le système endocrine



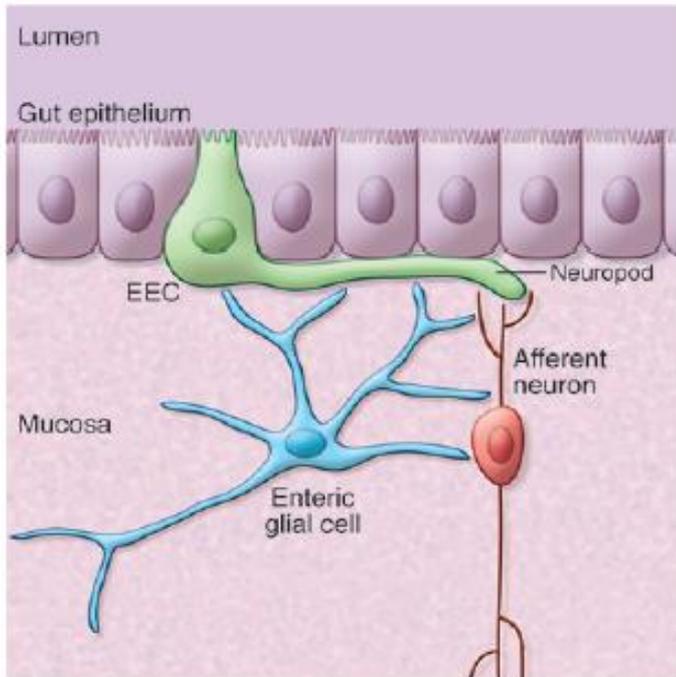
3. Le système endocrine

+ microbiote



4. Interactions Système endocrine/SNE

Le «gut connectome» : relais des signaux gastro-intestinaux pour une action locale et vers le cerveau



Cellules entéroendocrines

- peptides régulateurs de la prise alimentaire)

Système Nerveux Entérique

Nerf vague afférent

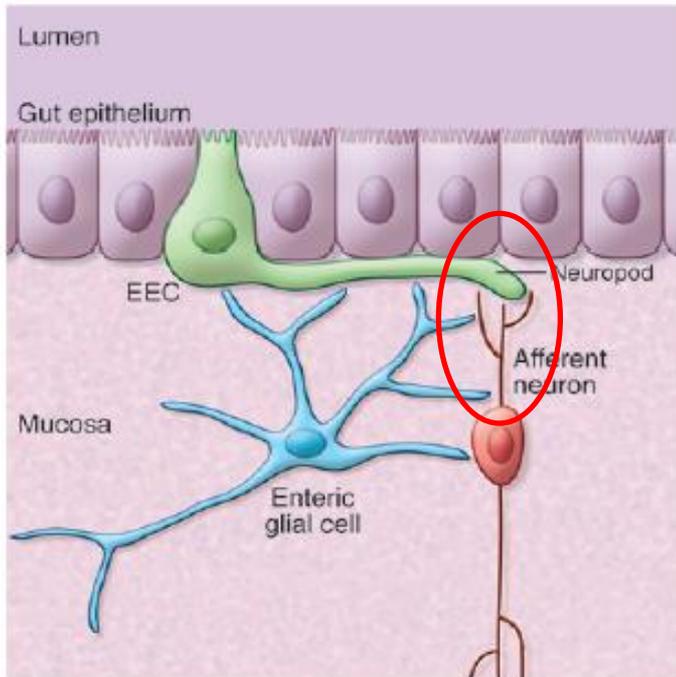
- intègre les signaux neuroendocrines

SNC

Bohorquez et al, 2015

4. Interactions Système endocrine/SNE

Le «gut connectome» : relais des signaux gastro-intestinaux pour une action locale et vers le cerveau



Cellules entéroendocrines

- peptides régulateurs de la prise alimentaire)

Système Nerveux Entérique

Nerf vague afférent

- intègre les signaux neuroendocrines

SNC

Bohorquez et al, 2015

Quel type de message? Neurohormonal? Synapse? Quel neurotransmetteur?



[Science](#)
Vol 361, Issue 6408
21 September 2018

Publication Kaelberer et al. 2018. Science 361, 1219

Hypothèse: les CEE « font synapses » avec le nerf vague pour transmettre un message sensoriel (type présence de nutriment) de l'intestin au cerveau

Argumentation:

- Les CEE partagent des points communs avec d'autres systèmes épithéliaux de transduction de signaux sensoriels
 - Récepteurs du goût (Höfer et al, 1996; Samuel et al., 2007), olfactifs (Braun et al, 2007), mécanorécepteurs (Samuel et al, 2007, Jang et al. 2007)
 - Cellules excitables: canaux ioniques voltage-dépendants (Reimann et al. 2007; Rogers et al. 2011)
- 2/3 des CEE forment des contacts avec des neurones sensoriels (Pgp9,5) (Borhorquez et al. 2015)
- Déjà montré pour les cellules entérochromaffines (sérotonine) et les neurones sensoriels du côlon (Bellono et al. 2017)

Quelles questions pour répondre à l'hypothèse?

Stratégie: cheminement scientifique

1. Les CEE sont-elles équipées pour « faire synapse »? Expression de marqueurs présynaptiques?

- Vésicules de sécrétion; adhésion..

2. Les CEE font-elles synapse avec les neurones sensoriels et notamment les fibres du nerf vague?

3. Les CEE transmettent-elles un signal nutritionnel aux neurones afférents du nerf vague?

4. Quel est le neurotransmetteur?

Comment? Quel modèle? Quelles méthodes?

(Stratégie: matériel et méthodes)

Objectif 1 : recherche d'expression de marqueurs présynaptiques

- Vésicules de sécrétion; adhésion..

- **Comment étudier les CEE qui ne représentent que 1 à 3 % des cellules épithéliales totales?**
 - **Lignées issues de tumeurs neuroendocrines (STC-1, GLUTaG...)**
 - **Cultures primaires de CEE: les isoler du tissu ou d'organoïdes, si besoin les maintenir en culture (tri sur la base d'un marqueur fluorescent)**
- 
- **Modèles transgéniques exprimant des protéines fluorescentes reportrices de l'expression des neuropeptides (CCK, PYY...) (Talen; CRE/Lox; ...)**

Culture d'organoïdes (« mini-gut ») en Matrigel

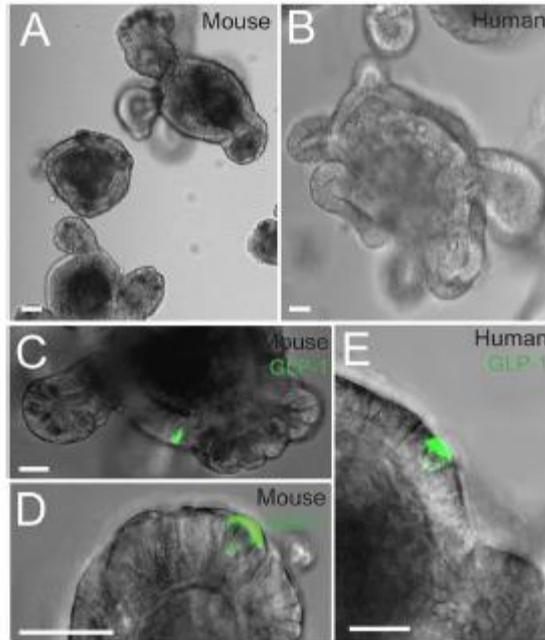


Figure 1—A: Mouse organoids embedded in Matrigel and cultured for 4 days. B: Human organoids in Matrigel, cultured for 10 days. L cells in villus (C) and crypt region (D) of mouse organoids and in human organoids (E) are identified by GLP-1 immunostaining (green). Scale bars: 20 μm.

A partir de cryptes dans le jéjunum (marquage IHC GLP-1)

- Prolifération/différenciation
- Sécrétion

c

Petersen et al, Diabetes, 2014

Comment? Quel modèle? Quelles méthodes? (Stratégie: matériel et méthodes)

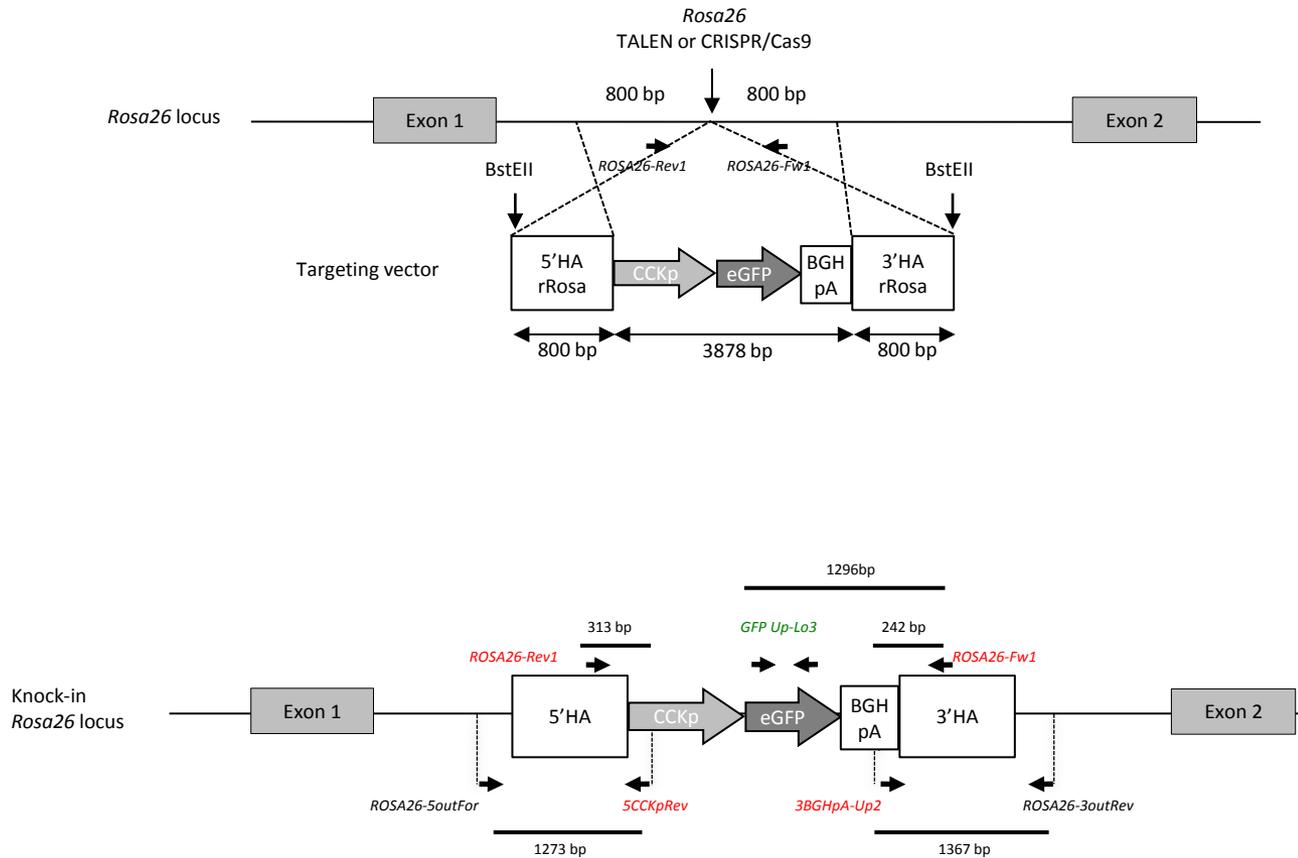
Objectif 1 : recherche d'expression de marqueurs présynaptiques - Vésicules de sécrétion; adhésion..

- Comment étudier les CEE qui ne représentent que 1 à 3 % des cellules épithéliales totales?
- Lignées issues de tumeurs neuroendocrines (STC-1, GLUTaG...)
- Cultures primaires de CEE: les isoler du tissu ou d'organoïdes, si besoin les maintenir en culture (tri sur la base d'un marqueur fluorescent)
- Modèles transgéniques exprimant des protéines fluorescentes reportrices de l'expression des neuropeptides (CCK, PYY...) (Talen; CRE/Lox; ...)

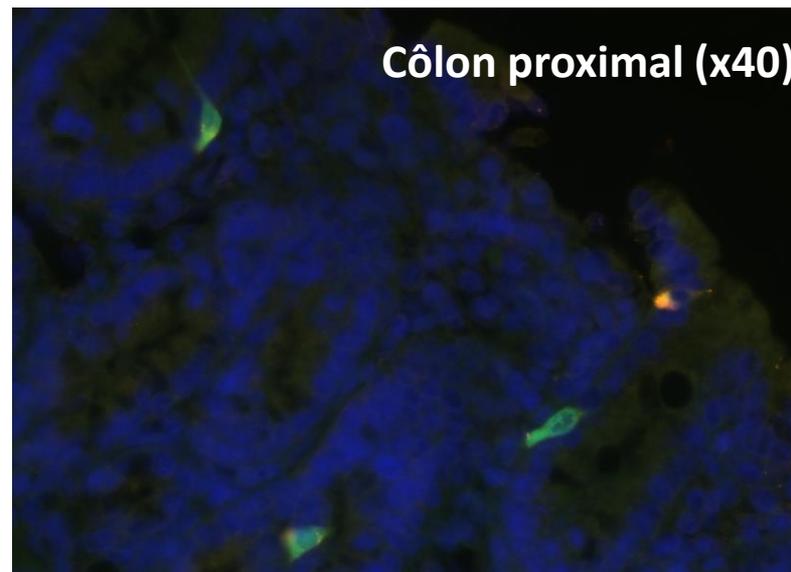
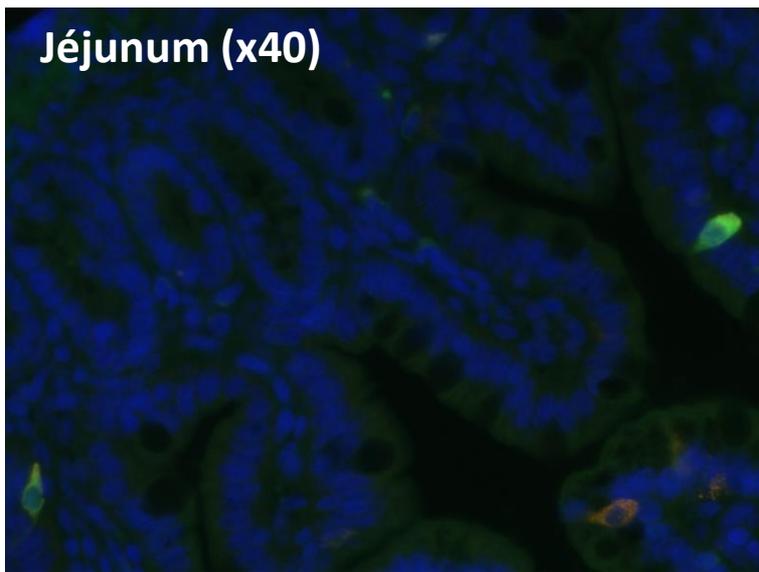
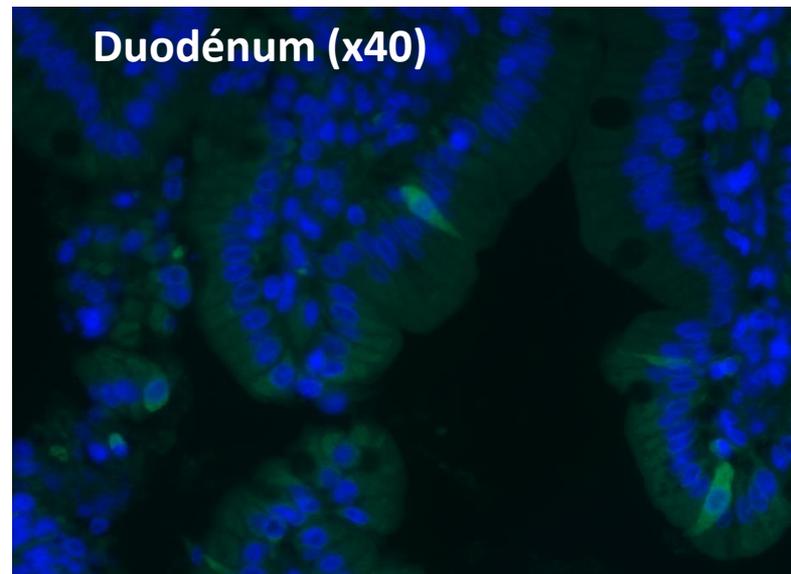
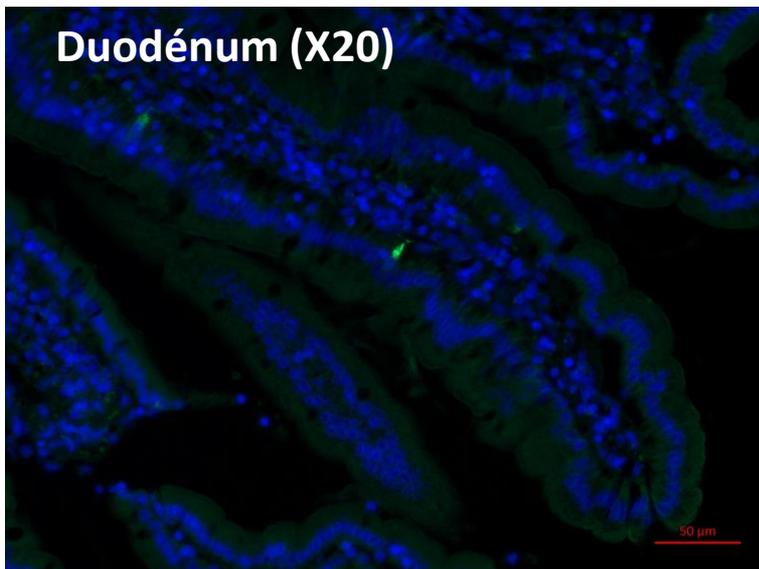


Modèle de rat transgénique KI

Ex: Construction d'une cassette pCCK-GFP

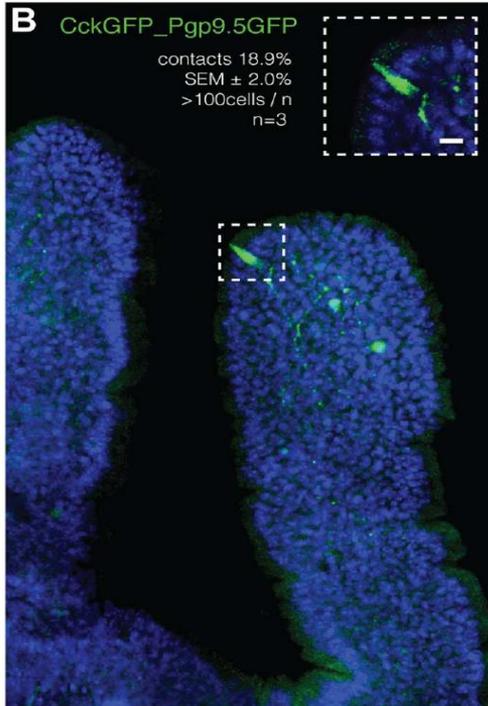


Les CEE synthétisant de la CCK (I cells) sont fluorescentes



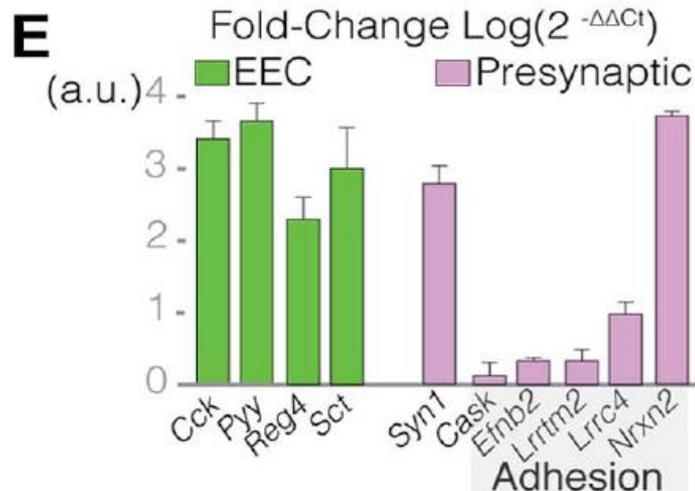
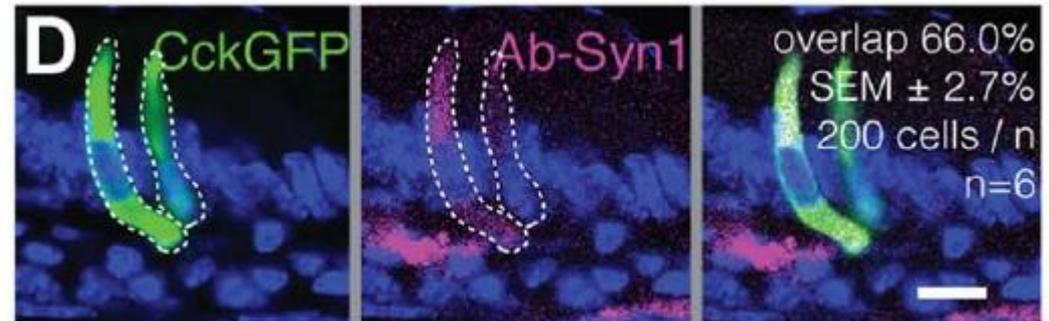
Marquage chromogranine A (rouge)

Modèle de souris transgénique qui exprime à la fois CCK-GFP et Pgp 9.5-GFP



- Visualisation des CEE CCK et des neurones sensitifs Pgp 9.5
- Proximité, contact pour 20% des CEE-CCK

Immunofluorescences synapsin1 sur modèle de souris transgénique CCK-GFP



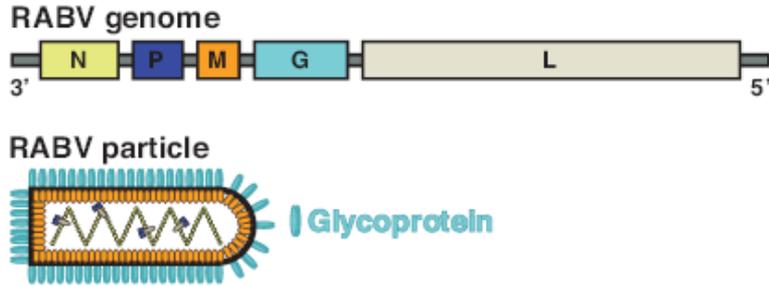
qRT-PCR sur CEE-CCK isolées (FACS)

Objectif 2. Montrer une transmission synaptique entre CEE et neurones

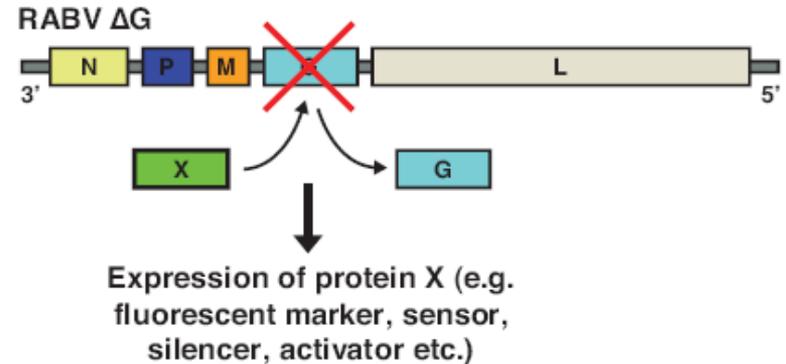
Traçage des circuits neuroépithéliaux par stratégie d'infection virale

- Virus de la rage (RABV) : neurotrope, transport rétrograde (axone vers corps cellulaire), propagation exclusivement synaptique
- Utilisation de variant modifié génétiquement: glycoprotéine d'enveloppe rabG remplacée par GFP

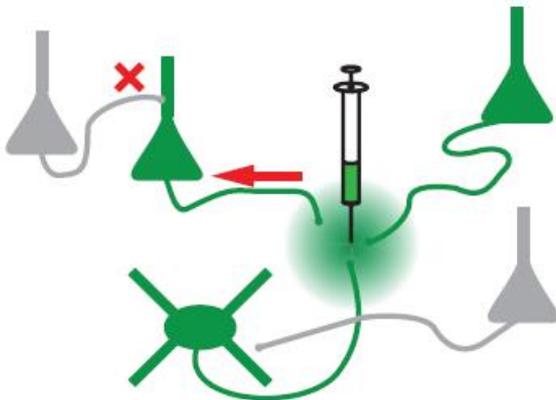
A Wild-type rabies virus



B Glycoprotein deletion — monosynaptic restriction



D infection of axon terminals — retrograde tracing

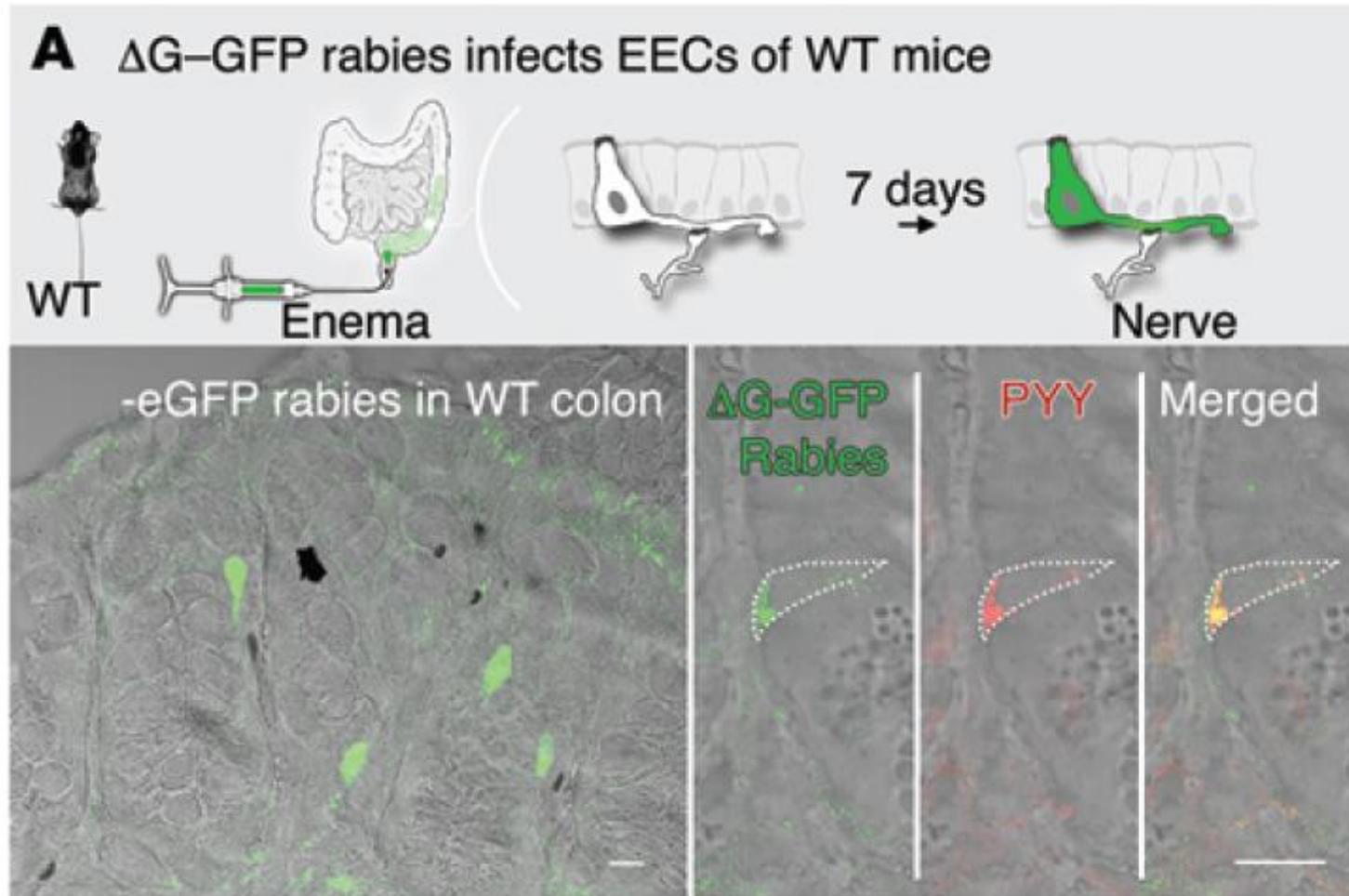


Accumulation de fluorescence dans les neurones à proximité du site d'injection

Objectif 2. Montrer une transmission synaptique entre CEE et neurones

Traçage des circuits neuroépithéliaux par stratégie d'infection virale

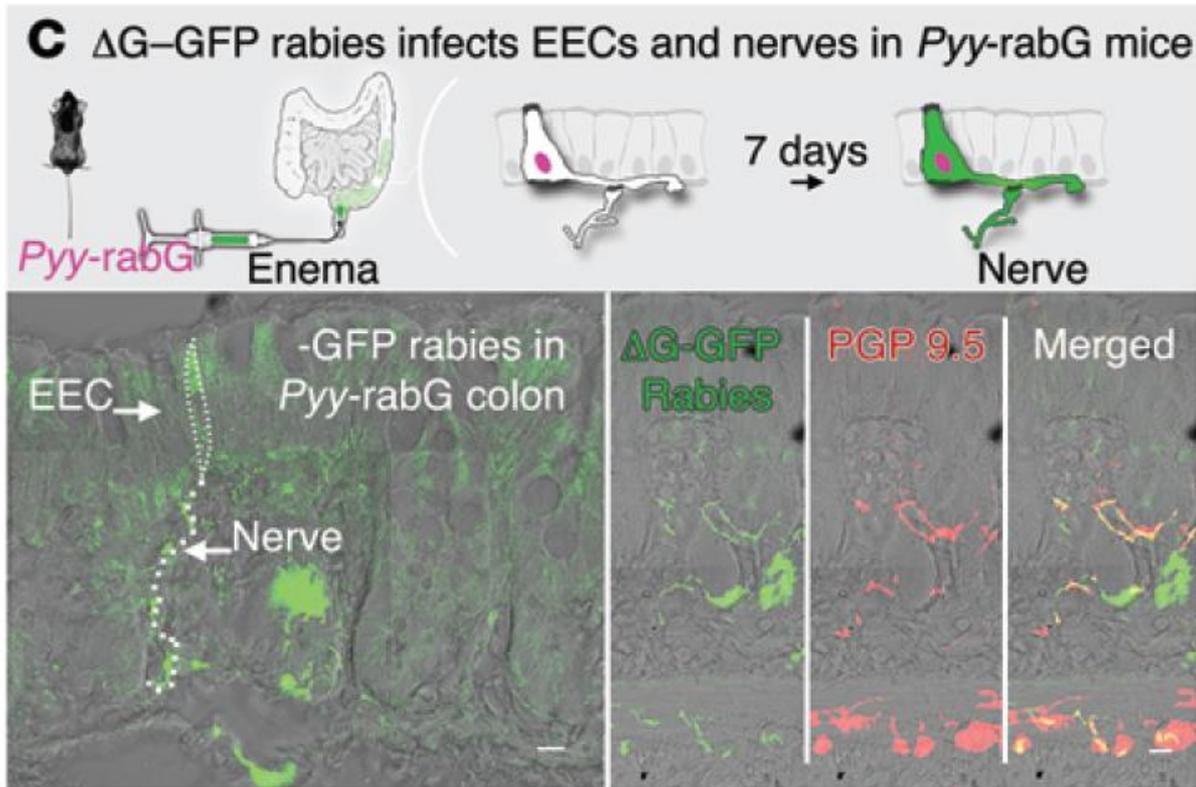
Infection virale des souris WT par enema (lavement) :



Objectif 2. Montrer une transmission synaptique entre CEE et neurones

Traçage des circuits neuroépithéliaux par stratégie d'infection virale

Restauration de la capacité de RABV à se propager de façon trans-synaptique en faisant exprimer rabG dans la cellule source (cellule infectée)



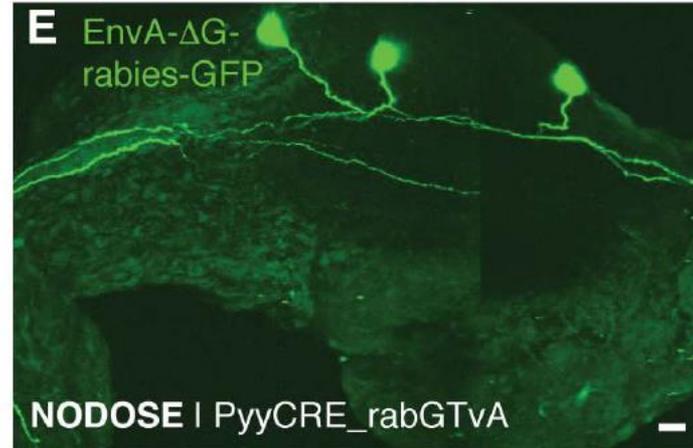
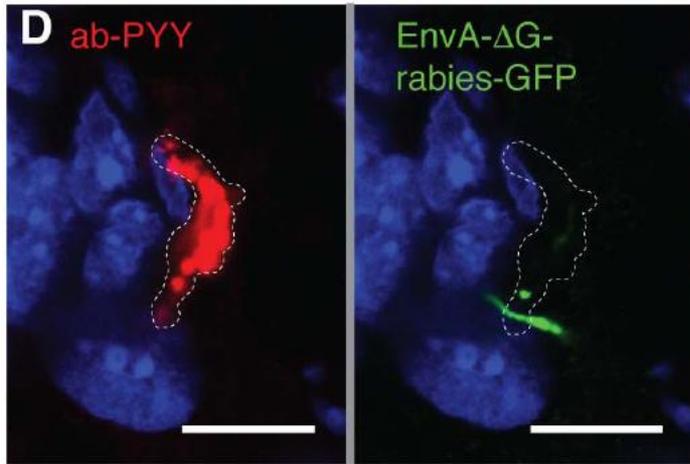
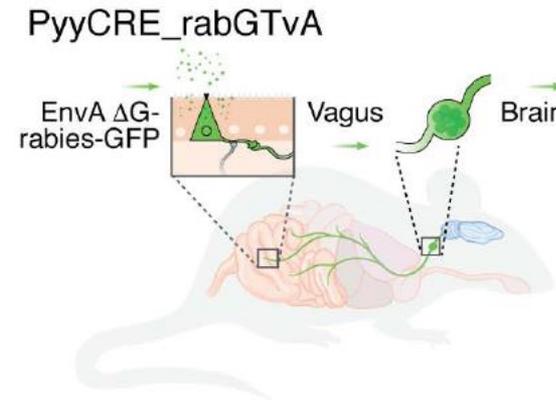
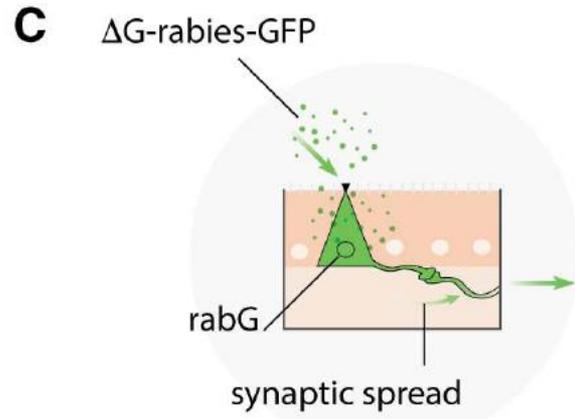
Dans ce modèle de souris Tg, seules les CEE-Pyy expriment rabG (système Cre-Lox)

- 7j post enema : fluorescence verte dans les fibres nerveuses de la lamina propria du côlon distal (confirmée par IF Pgp9,5)
- Critique: la fluo verte est-elle due à infection virale des CEE ou des neurones rencontrés?

Objectif 2. Montrer une transmission synaptique entre CEE et neurones

Traçage des circuits neuroépithéliaux par stratégie d'infection virale

Cibler l'infection virale sur les CEE-PYY : souris Tg PyyCRE_rabG-Tva

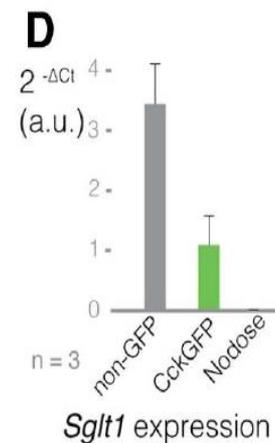
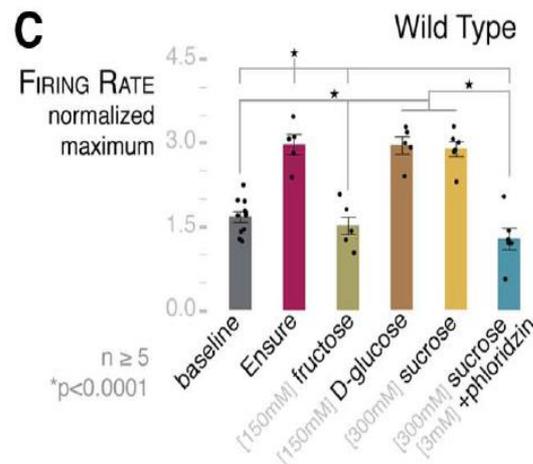
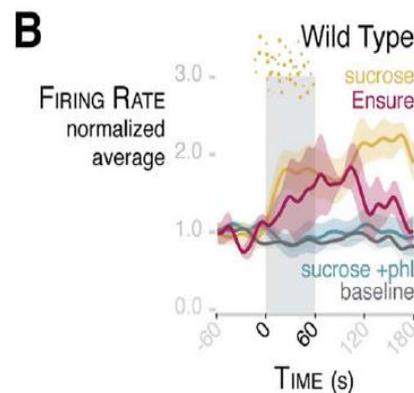
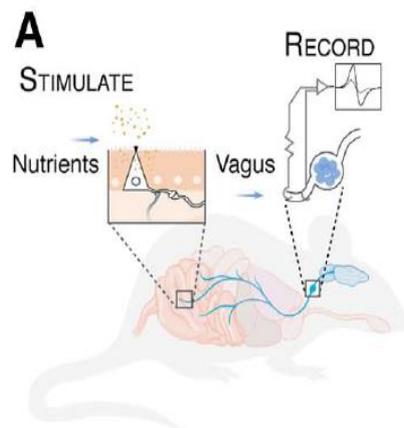


Propagation du virus depuis la CEE-PYY au neurone adjacent et jusqu'au ganglion plexiforme (nerf vague)

Objectif 3: montrer que les CEE transmettent un signal nutritionnel aux neurones afférents du nerf vague

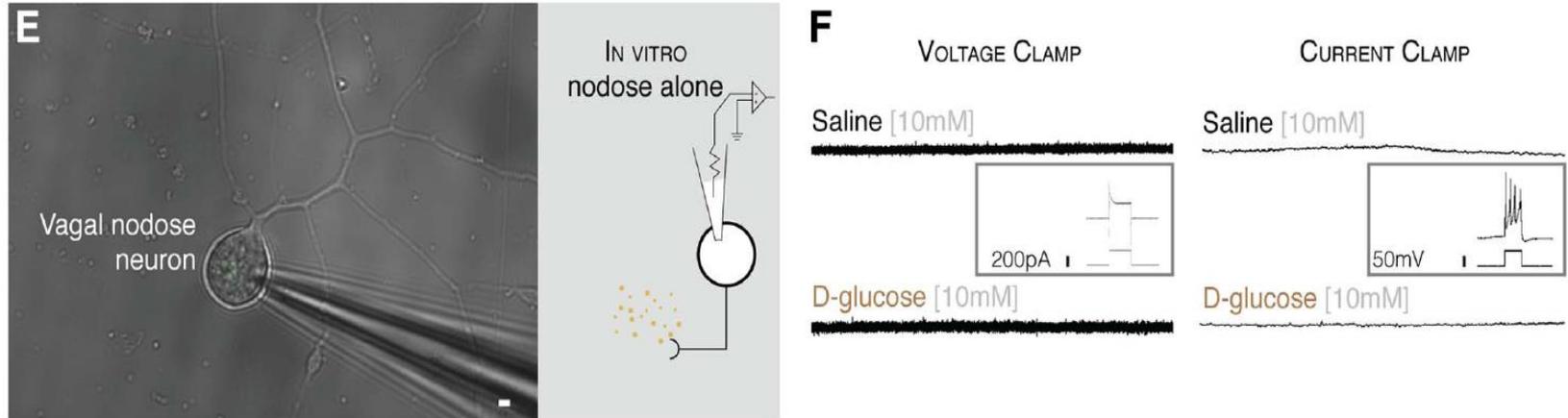
Effet d'une stimulation nutritionnelle (lumière intestinale) sur ce circuit CEE-neurone

In vivo

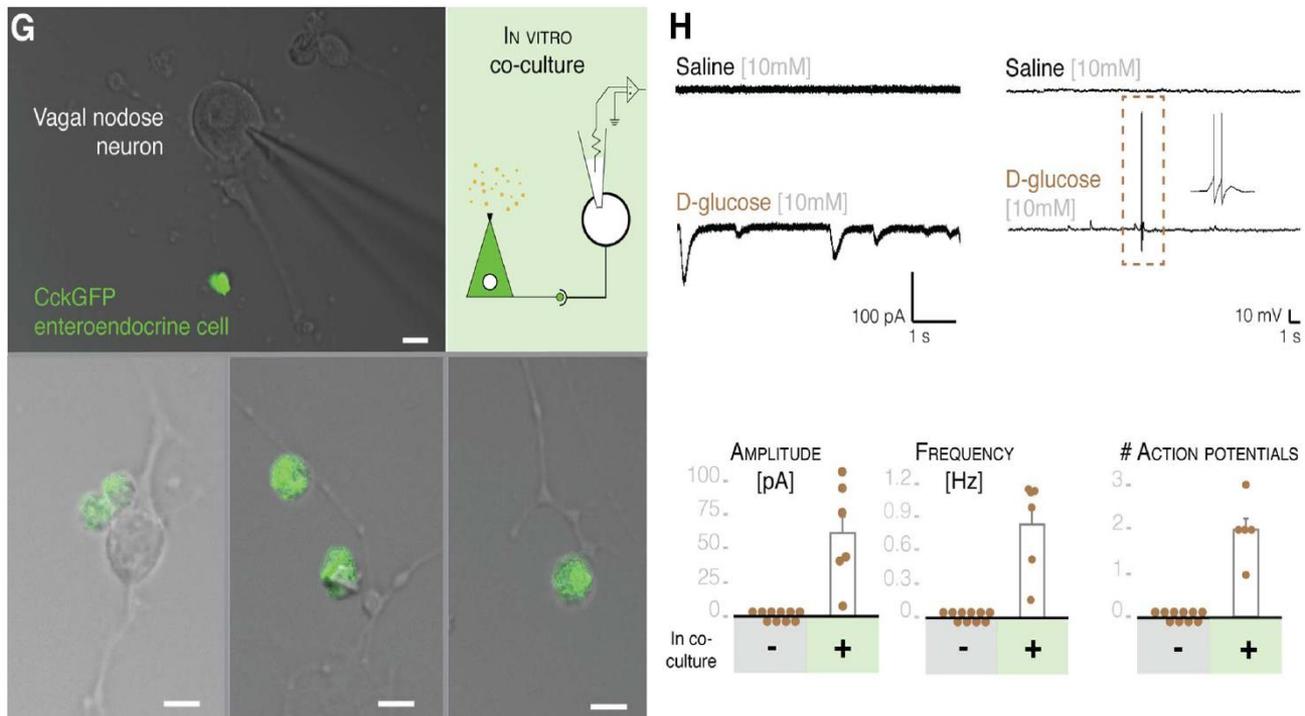


- Activité électrique vagale (électrodes externes sur nerf entier) augmentée par solution nutritive (Ensure) et plus spécifiquement le glucose
- Effet bloqué par inhibiteur du transporteur de glucose Sglt1, exprimé par CEE mais pas dans le ganglion plexiforme.

In vitro: culture de neurones de ganglion plexiforme seuls



In vitro: co-culture de neurones de ganglion plexiforme avec des CEE CCK-GFP

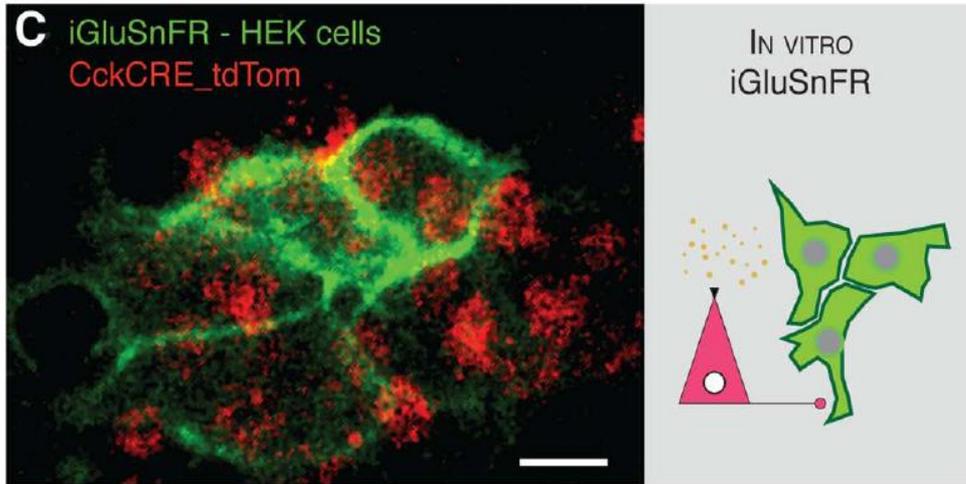


Objectif 4. Identifier le neurotransmetteur

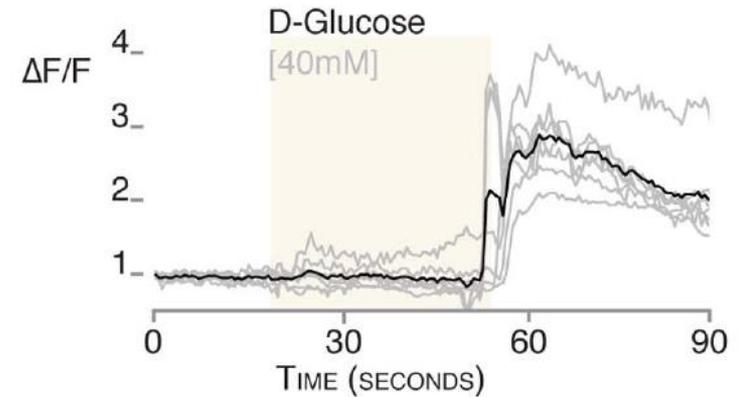
Hypothèse glutamate comme de nombreux autres systèmes de transduction de signaux sensoriels

Les CEE libèrent-elles du glutamate?

- Transfection stable d'une protéine « sniffeuse » iGluSnFR : fluoresce en présence de glutamate dans cellules de la lignée HEK (réponse au glutamate devient positive)
- Co-culture avec des CEE CCK-CRE_tdTomato



D Glutamate release

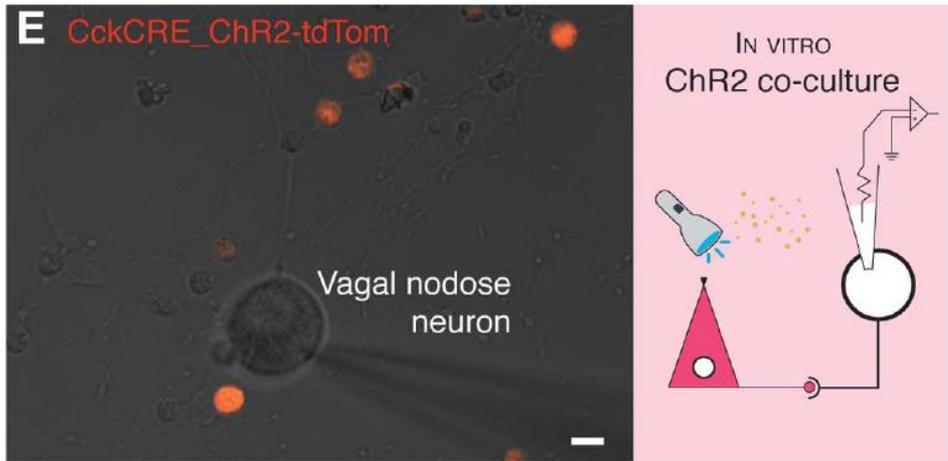


Le glutamate est-il le neurotransmetteur impliqué dans la synapse CEE-fibres vagales?

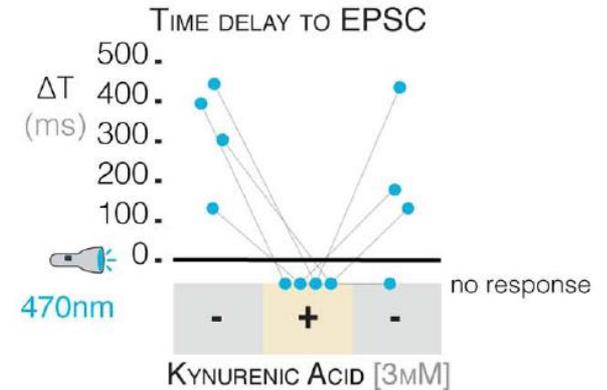
Objectif 4. Identifier le neurotransmetteur

Optogénétique: activation ou inhibition d'un type cellulaire par exposition lumineuse

Co-culture de CEE CckCRE-ChR2-td Tomato (expression de channel rhodopsin2, canal ionique excité par la lumière (473 nm) et neurones du ganglion plexiforme



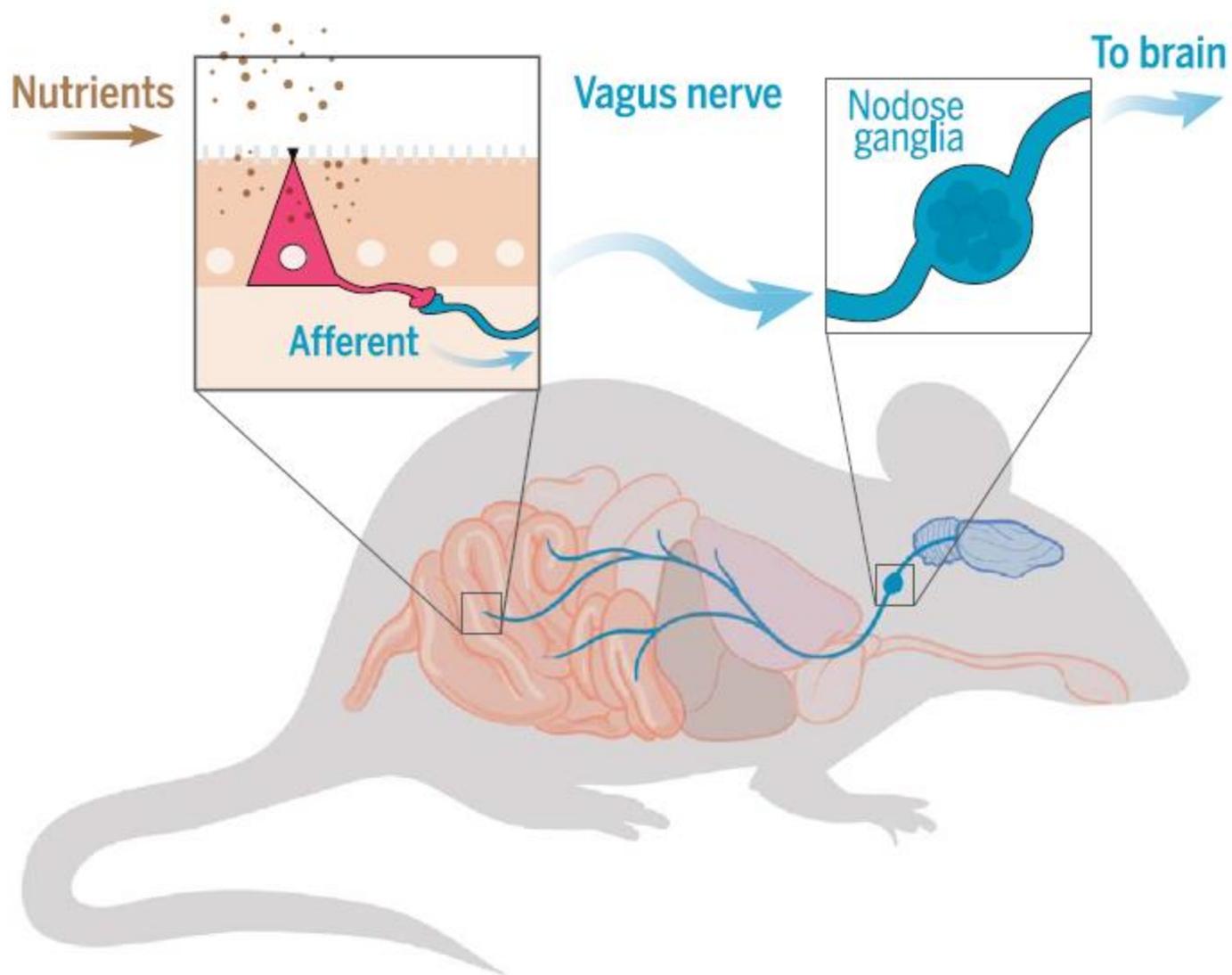
F Ionotropic transmission



Mesure des courants postsynpatiques (EPSC) par patch clamp du neurone vagal

En présence ou absence d'acide kynurénique : bloque les récepteurs au glutamate

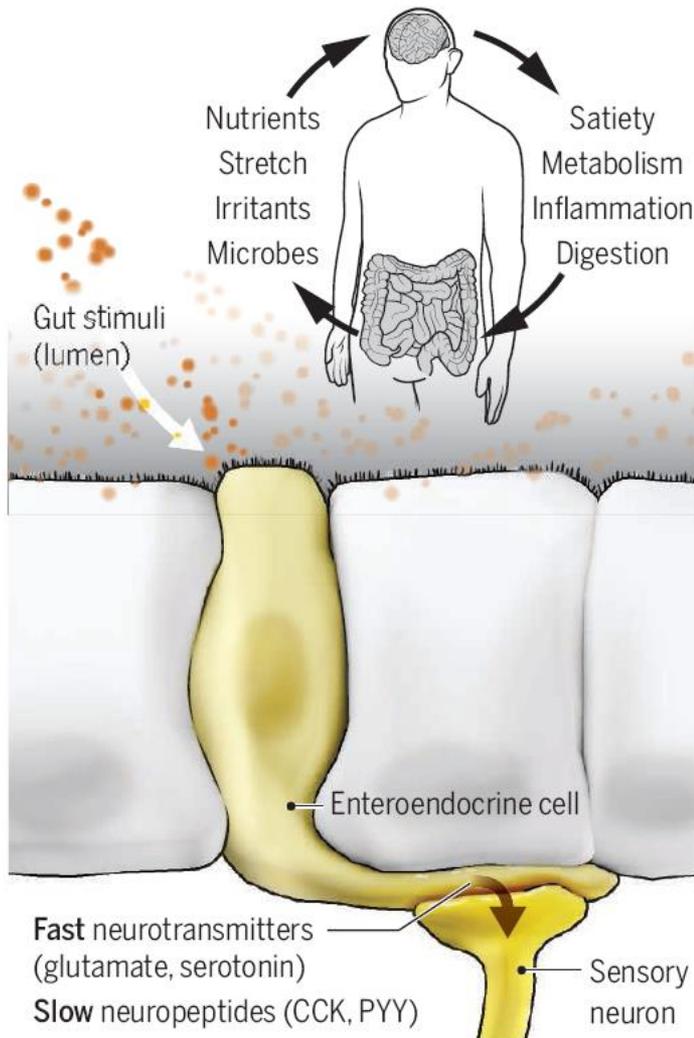
A gut brain neuroepithelial circuit



Communication bi-directionnelle intestin-cerveau

Rôle de cette transmission synaptique CEE-nerf vague :

- Transmission temporelle précise des signaux sensoriels de la lux du TD au SNC
- Régulation en feed-back et en temps réel de fonctions digestives (motricité), les sécrétions de peptides GI agissant à plus long terme (satiété)
- Plasticité selon les stimuli sensoriels qui arrivent dans la lumière intestinale (selon type de CEE le long du TD)



Perspectives

- Détection des métabolites microbiens: même relais?
- Chemin pour les virus vers le SNC?

Enjeux

- Pathologies intestinales
- Pathologies métaboliques