

Immunologie

Portes d'entrée dans la muqueuse intestinale : vers une modélisation en culture des cellules M des plaques de Peyer

Échantillonnage des antigènes et des micro-organismes au niveau de la barrière épithéliale digestive

Dans le tractus gastro-intestinal, l'échantillonnage des antigènes et le déclenchement d'une réponse immunitaire locale a lieu au niveau des plaques de Peyer. Ces plaques de Peyer sont formées d'un épithélium intestinal particulier, recouvrant un ou plusieurs follicules lymphoïdes, constitués de lymphocytes B organisés en un centre germinatif, de lymphocytes T formant une couronne entourant ce centre germinatif, de macrophages et de cellules dendritiques présentant les antigènes. L'épithélium associé aux follicules est composé d'une monocouche de cellules épithéliales entérocytaires, dans laquelle on trouve un nombre variable de cellules M dispersées (10 % à 50 % selon les espèces). Les cellules M, cellules épithéliales de même origine que les entérocytes adjacents, en diffèrent morphologiquement par l'absence d'une bordure en brosse organisée et par la présence d'une large invagination de la membrane plasmique baso-latérale, qui contient des cellules immunitaires [1]. D'un point de vue fonctionnel, ces cellules M ont, au contraire des entérocytes, la capacité de transporter les antigènes et les micro-organismes à travers la barrière épithéliale et de les transférer au niveau du follicule lymphoïde, où ils sont capturés par les cellules présentatrices professionnelles, cellules dendritiques ou macrophages. Une réponse immunitaire locale peut alors se mettre en place, au cours de laquelle les lymphocytes B présents dans le follicule subiront une com-

mutation isotypique des immunoglobulines en classe A (IgA). Après différenciation, ces lymphocytes migrent à distance dans les muqueuses et sécrètent ces IgA sous forme dimérique. Celles-ci sont transportées par les entérocytes vers la lumière intestinale, induisant en retour une protection locale [2, 3].

La translocation des antigènes par les cellules M est donc l'étape initiale et indispensable au développement d'une réponse immunitaire, mais aussi à l'acquisition du phénomène de tolérance, qui permet à des antigènes étrangers (nutrition, flore commensale) d'être considérés comme des antigènes du soi.

Paradoxalement, les cellules M jouent également un rôle important dans la pathogénie de nombreuses maladies infectieuses. Les micro-organismes pathogènes doivent, pour exercer leurs effets physiopathologiques, interagir et/ou franchir les barrières muqueuses. Les cellules M sont utilisées de façon opportuniste comme portes d'entrée par nombre d'entre eux, virus (polyovirus, réovirus, VIH), ou bactéries (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio cholerae*) [4].

On voit donc l'intérêt que représente une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires du contrôle de cette translocation, pour la modélisation de vaccins ou de médicaments administré par voie orale, ou pour tenter d'enrayer les contaminations à une étape très précoce.

Pourtant, en raison de la rareté des cellules M dans les épithéliums muqueux, il n'est pas possible d'en obtenir des préparations purifiées et leur étude biochimique demeure à ce jour impossible. En outre, de

nombreuses tentatives destinées à identifier des marqueurs spécifiques n'ont pas abouti. La biologie cellulaire et moléculaire des cellules M n'est donc pas connue et les études sont restreintes à une méthodologie d'immunohistomorphologie *in situ*, qui permet d'observer mais pas d'expliquer. Nous avons développé deux approches expérimentales complémentaires, *in vivo* et en culture, pour tenter de modéliser la formation de l'épithélium associé aux follicules des plaques de Peyer et des cellules M [5].

Le transfert ectopique de cellules de follicules lymphoïdes dans le duodénum de souris BALB/c induit la formation de nouvelles plaques de Peyer

Une préparation de cellules immunitaires (principalement des lymphocytes B et T/CD4⁺) isolées à partir de follicules lymphoïdes de souris BALB/c a été injectée sous la muqueuse dans la partie proximale du duodénum, entre le pylore et la première plaque de Peyer. Après quelques jours, la formation de structures très proches de celles des plaques de Peyer (dôme, épithélium, cellules M, follicule lymphoïde) peut être observée. Ces résultats démontrent le rôle inducteur direct des cellules du follicule lymphoïde dans la différenciation de l'épithélium qui lui est associé et la formation des cellules M. L'emplacement relativement conservé des plaques de Peyer endogènes chez la souris est donc probablement déterminé par les sites de vascularisation et la formation d'un endothélium cuboïde (*high endothelial veinules*) permettant la colonisa-

tion par le contingent lymphoïde. L'induction de plaques de Peyer par transfert ectopique de cellules folliculaires montre qu'il est possible de court-circuiter cette voie naturelle de colonisation et d'induire la formation de cellules M à partir de cellules de cryptes intestinales qui normalement donneraient naissance à des villosités.

La co-culture d'entérocytes et de cellules du follicule lymphoïde permet de reconstituer *in vitro* les propriétés de l'épithélium associé aux follicules

Les résultats précédents montrent que les cellules souches intestinales sont capables de se différencier en cellules M sous l'influence d'une population lymphoïde exogène. Il paraît donc concevable d'envisager une induction de cellules M en culture à partir de lignées de cellules cryptiques ou de cellules entérocytaires déjà établies.

Un système de co-culture de lignées de cellules épithéliales intestinales entérocytaires (Caco-2), et de lymphocytes de plaques de Peyer de souris (dont la capacité d'induction a été démontrée précédemment *in vivo*) a donc été développé. Les cellules intestinales sont cultivées sur des filtres de porosité de 3 µm dans un système inversé, sur la face inférieure du filtre, jusqu'à ce qu'elles forment une monocouche étanche d'entérocytes différenciés. Les cellules folliculaires des plaques de Peyer de souris BALB/c donneuses sont alors ajoutées du côté basolatéral et les co-cultures sont maintenues de 1 à 5 jours. Les résultats obtenus montrent que les lymphocytes B et T sont capables de franchir la membrane poreuse, de dégrader la matrice cellulaire synthétisée par les cellules épithéliales et de se loger dans la monocouche épithéliale, sans exercer d'effets cytotoxiques. La lignée Caco-2 co-cultivée en présence de ces cellules maintient en effet une résistance transépithéliale d'environ 300 Ohm/cm² et une polarité de type épithélial. La présence de cellules folliculaires dans la monocouche épithéliale induit fréquemment une modification de la structure du pôle apical des cellules

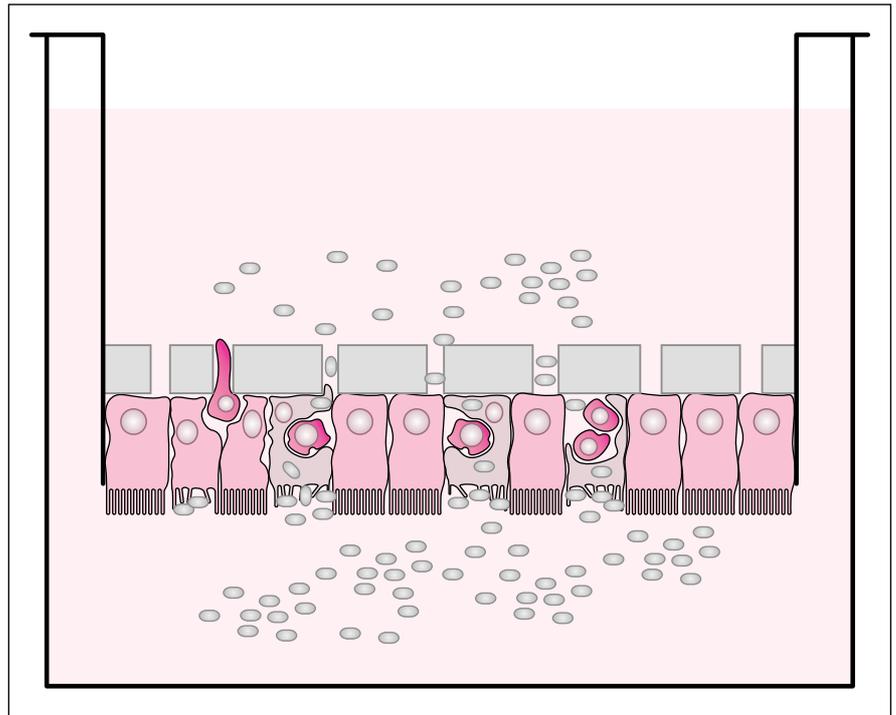


Figure 1. **Reconstitution en culture de l'épithélium associé aux follicules des plaques de Peyer.** Une monocouche de cellules entérocytaires (Caco-2, en rose) ensemencée sur une membrane poreuse (en gris) est co-cultivée en présence de lymphocytes isolés de plaques de Peyer (en rouge). L'interaction lympho-épithéliale induit la conversion de 20% à 40% des entérocytes en cellules présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de cellules M (poche baso-laterale contenant des lymphocytes, désorganisation de la bordure en brosse, capacité de transporter des particules ou des bactéries du compartiment apical vers le compartiment baso-latéral).

Caco-2 (bordure en brosse absente ou désorganisée, apparition d'excroissances membranaires à l'apex des cellules), associée à une diminution de l'expression apicale de la saccharase-isomaltase, et à une réorganisation du réseau apical d'actine et des protéines associées, comme nous l'avons précédemment montré *in vivo* [6].

D'un point de vue fonctionnel, les cellules Caco-2 co-cultivées avec les cellules folliculaires acquièrent spécifiquement la capacité de transporter des particules inertes (billes de latex fluorescentes) depuis le milieu apical vers le milieu basolatéral. La cinétique du transport est rapide, après un temps de latence de 10 min.

Ce système de co-culture nous permet donc de transformer une monocouche d'entérocytes développant une bordure en brosse homogène en un épithélium faisant apparaître des

propriétés de cellules M (propriétés de surface apicale modifiées, apparition d'excroissances membranaires apicales, redistribution du cytosquelette, disparition d'hydrolases spécifiques, nouvelle fonction de transport orienté de particules inertes).

L'interaction lympho-épithéliale induit la translocation de micro-organismes

Vibrio cholerae O1 Ogawa, une des souches responsables du choléra, adhère indifféremment aux entérocytes et aux cellules M, mais elle n'est transportée que par ces dernières, permettant son transfert vers le follicule lymphoïde sous jacent [7]. Ce transport permet la mise en place d'une réponse immunitaire contre *Vibrio cholerae* et la toxine cholérique, alors que la virulence est due princi-

palement à l'activité de la toxine, à l'origine de la forte déshydratation des sujets atteints. Nous avons étudié comparativement l'adhérence, l'invasion et la translocation de cette bactérie sur les cellules Caco-2 et les co-cultures. Les bactéries sont placées dans la chambre inférieure, faisant face au pôle apical des cellules épithéliales, à raison de 10^8 bactéries/filtre. Les temps d'infection sont compris entre 15 minutes et 1 heure, période durant laquelle la résistance électrique trans-épithéliale des monocouches ou des co-cultures n'est pas affectée. L'adhérence de *Vibrio cholerae* a été observée par marquage immunocytochimique de la bactérie et des cellules Caco-2 ou des co-cultures. Il n'y a pas de différence significative entre les deux systèmes, ce qui est en accord avec les observations *in vivo*, montrant qu'il n'y a pas d'adhérence préférentielle aux cellules M. En revanche, le nombre de *Vibrio cholerae* intracellulaires (quantifié après incubation en présence de gentamycine) dans les co-cultures (8.10^3 CFU/cm² de culture), est 8 fois plus important que celui observé dans les cellules Caco-2 (10^3 CFU/cm²). Ce résultat est corrélé aux observations faites en microscopie confocale après marquage immunocytochimique des *Vibrio cholerae* et de la surface apicale des cellules intestinales. La translocation est suivie par le dénombrement

des bactéries vivantes présentes dans le milieu baso-latéral des cellules Caco-2 et des co-cultures après des temps variables d'incubation. Des prélèvements successifs sont effectués, permettant de suivre sur un même filtre l'évolution de cette activité de translocation au cours du temps. Nous avons détecté une augmentation de la translocation d'un facteur 100 après 1 h d'infection des co-cultures. Cette translocation ne se produit pas à 4 °C et est inhibée par la colchicine. La microscopie électronique à transmission permet de montrer que la translocation de *Vibrio cholerae* se fait par voie intracellulaire en révélant la présence de vacuoles cytoplasmiques contenant des bactéries. Certaines bactéries se trouvent également au contact des lymphocytes présents dans les poches extracellulaires qui se forment dans la monocouche épithéliale.

Le modèle en culture de franchissement de la barrière épithéliale intestinale (figure 1) permet d'utiliser des méthodes ultrastructurales et immunocytologiques, dans un système dont les paramètres sont contrôlés. Il permet également de développer et d'utiliser des méthodes quantitatives et cinétiques, donnant accès aux étapes précoces de l'infection simulée. La nature moléculaire de l'interaction micro-organisme-surface intestinale peut y être étudiée par des

méthodes biochimiques. Ce modèle devrait donc faciliter l'identification de la voie de passage des micro-organismes au travers de l'épithélium intestinal et d'identifier les voies de transmission intracellulaire du signal responsables de la translocation, puisqu'il se prête bien à l'utilisation d'inhibiteurs.

**E.P.
S.K.**

1. Butor C, Couëdel-Courteille A, Venet A, Guillet J. Immunité locale et vaccination. *Med Sci* 1995; 11: 703-11.
2. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Monoclonal secretory IgA for protection of the intestinal mucosa against viral and bacterial pathogens. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, eds. *Handbook of Mucosal Immunology*. New York: Academic Press, 1994: 403-10.
3. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 275-300.
4. Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol* 1996; 4: 22-9.
5. Kernéis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 1997; 277: 949-52.
6. Kernéis S, Bogdanova A, Colucci-Guyon E, Kraehenbuhl JP, Pringault E. Cytosolic distribution of villin in M cells from mouse Peyer's patches correlates with the absence of a brush border. *Gastroenterology* 1996; 110: 515-21.
7. Owen RL, Pierce NF, Apple RT, Cray WC Jr. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis* 1986; 153: 1108-18.