



HAL
open science

Etude de l'effet d'un traitement par *Faecalibacterium prausnitzii* dans un modèle pré-clinique d'atteintes colorectales radio-induites

Alexia Lapiere

► **To cite this version:**

Alexia Lapiere. Etude de l'effet d'un traitement par *Faecalibacterium prausnitzii* dans un modèle pré-clinique d'atteintes colorectales radio-induites. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS147 . tel-03254201

HAL Id: tel-03254201

<https://theses.hal.science/tel-03254201>

Submitted on 8 Jun 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales (LRMed)

et Institut Micalis (INRA)

Etude de l'effet d'un traitement par *Faecalibacterium prausnitzii* dans un modèle pré-clinique d'atteintes colorectales radio-induites

Par Alexia Lapière

Thèse de doctorat de Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Dirigée par le Docteur Marc Benderitter

Codirigée par le Docteur Jean-Marc Chatel

Encadrée par le Docteur Alexandra Sémont

Présentée et soutenue publiquement le 21 février 2020

Devant un jury composé de :

Professeur Harry Sokol (PU-PH)

Président

Docteur Anne-Judith Waligora-Dupriet (MD)

Rapporteuse

Professeur Xavier Treton (PU-PH)

Rapporteur

Professeur Eric Deutsch (PU-PH)

Examineur

Docteur Claire Cherbuy (IR)

Examinatrice

« Once you eliminate the impossible, whatever remains, no matter how improbable, must be the truth. » - Sherlock Holmes

Sir Arthur Conan Doyle

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer les travaux que j'ai réalisés durant ces trois années de thèse. Je remercie le **Professeur Harry Sokol** pour avoir accepté le rôle de président de ce jury. Je remercie le Professeur **Xavier Treton** et le **Docteur Anne-Judith Waligora-Dupriet** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Enfin, merci au **Professeur Eric Deutsch** et au **Docteur Claire Cherbuy** pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je souhaiterais remercier également le **Docteur Marc Benderitter** et le **Docteur Jean-Marc Chatel**, qui ont accepté tous deux de co-diriger cette thèse. Vous avez su m'aiguiller durant cette thèse, en particulier durant l'écriture du manuscrit, en m'apportant vos connaissances spécifiques à vos domaines respectifs.

Alexandra, j'ai énormément appris grâce à toi, autant sur l'aspect connaissances que sur l'aspect compétences de travail. J'ai affuté mon perfectionnisme, grâce à ton souci du détail et à ta précision dans tes propos. Merci pour ton soutien indéfectible et à ta façon de me pousser à donner le meilleur de moi-même durant les congrès et dans tout ce que je faisais en général, j'ai énormément gagné en confiance en moi et en mon travail. Je n'oublierai pas nos instants partagés durant les expérimentations animales (les chambres d'Ussing, qui m'ont sûrement traumatisée à jamais), on a fini par y arriver, à force de persévérer ! Certaines de tes expressions étranges me resteront en tête pour longtemps (comme « avoir de la peau de saucisson dans les yeux » qui m'a toujours fait beaucoup rire).

Merci beaucoup à **Fabien** pour sa présence, sa bienveillance et ses conseils avisés tout au long de cette thèse. Tu as pris le temps, même quand tu n'en avais pas beaucoup, pour m'aider dans mes corrections, dans l'analyse de mes résultats et de manière générale quand j'avais besoin de tes conseils éclairés.

Un immense merci à **Véronique**, la cultivatrice en chef de *F. prausnitzii*. Sans toi, cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu ! Grâce à toi, nous avons pu mener à bien nos expériences, malgré les caprices de cette bactérie difficile à apprivoiser. Nous avons passé de très bons moments ensemble lors de nos récoltes en duo à la chambre de Freter, ta gentillesse et ta sociabilité sont des qualités qui m'ont aidé à me sentir à l'aise lorsque je suis venue les premières fois à l'INRA. Je suis très contente d'avoir de nouveau l'occasion de te voir durant mon prochain

post-doc ! Je remercie également **Sandrine**, qui nous a aidées pour les analyses statistiques du microbiote et que j'espère ne pas avoir rendu folle avec mes demandes incessantes de changements pour les figures de l'article.

Un très grand merci à **Yoann** également, avec qui les irradiations assez ennuyeuses sont devenues des moments sympathiques et conviviaux. Je pense que l'on pourrait te décerner un diplôme de psychologie pour avoir été la personne à qui on raconte tous nos petits soucis durant les séances à l'Alphée, grâce à ton écoute et à ta disponibilité. Nos discussions sur les sorties ciné et les séries vont beaucoup me manquer ! J'en profite pour également remercier **Miray**, qui a repris le flambeau de l'Alphée, et avec qui j'ai eu l'occasion de faire des irradiations vers la fin de ma thèse. Ta bonne humeur m'a apporté un peu de bonheur durant ces derniers mois.

Je remercie également les autres membres du laboratoire : **Christelle, Claire** et **Georges**, vous avez pris le temps de m'aider et de me conseiller dans mes manips, merci beaucoup ! **Noëlle**, qui m'a permis de rentrer à l'IRSN à l'origine, en me choisissant pour un stage en 2016, et qui est restée très présente durant ma thèse, encore merci ! **Vincent**, merci de nous avoir aidé à mettre au point nos manips à l'Incucyte, même si finalement les résultats n'ont pas été très concluants, cela a été très instructif. Merci à **Agnès**, pour sa bienveillance et sa bonne humeur quotidienne ainsi que ses conseils qui m'ont beaucoup aidé ! Enfin, merci à **Christine, Olivier** et **Alain** pour leur bienveillance et leur gentillesse.

Annaïg, Mariam, on aura finalement survécu à ces trois années de thèse ! Je n'oublierai pas votre accueil chaleureux au sein du groupe des « jeunes » au tout début de ma thèse. On est restées solidaires et complices, ça a été un réel plaisir de travailler avec vous deux. Ces derniers mois auront été compliqués pour chacune de nous, mais nous avons surpassé cette épreuve et je pense qu'on peut être fières de nous !

Une petite pensée pour **Mallia**, Mallia banana, qui m'a beaucoup aidé lors de son stage et durant les premiers mois de sa thèse. Ton grain de folie m'a donné le sourire, même dans les moments difficiles. Ton sens de l'écoute, ton ouverture d'esprit et tes conseils avisés m'ont aidé à avancer, à prendre du recul et à voir mes soucis sous un autre angle pour mieux les aborder. Je te souhaite bon courage pour ta thèse, accroche-toi et donne tout ! (et fais bien ton cahier le labo hihhi).

Je remercie aussi **Sarah**, ma petite loutre, qui a aussi été une rencontre très importante durant ma thèse. Tu es arrivée pile poil au moment où les choses sérieuses commençaient pour moi dans ma thèse, un peu comme une fée, pour mettre des paillettes dans ma vie. Tu as toujours été disponible pour m'aider, m'écouter ou juste être présente quand le moral était bas (même si ça me coûtait mes gâteaux et mon chocolat, ça valait le coup hihihi :)).

Ma petite **Ségo**, que j'ai vraiment appris à connaître durant ma dernière année malheureusement, merci beaucoup pour ta bonne humeur constante, tes petites attentions et ta curiosité à toute épreuve ! Nos moments covoiturage ont été ma petite session relaxation ces derniers mois, discuter avec toi m'a beaucoup aidé à me détendre lorsque ça devenait difficile durant l'écriture de ce manuscrit. **Emilie**, je te souhaite le meilleur pour cette nouvelle aventure qu'est la parentalité ! Au pire, si je me souviens bien, Sarah t'avais proposé de garder ton petit bout si tu as besoin de respirer, profite-en (haha) ! Ta petite frimousse va me manquer ! **Clément**, il semble que l'équipe va finalement accueillir d'autres individus masculins, ton calvaire va enfin prendre fin ! Bon courage pour la fin de ta thèse !

Je remercie également tous les anciens de l'IRSN qui sont partis au cours de ma thèse et qui m'ont aidé, chacun à leur manière. **Fred, Amélie, Cyprien, Jérémy, Benoît, Lara, Alexandre et Alison**, pour leurs conseils sur le déroulement de la thèse, mais aussi leur gentillesse et leur bienveillance. **Sandra**, notre rayon de soleil, qui illuminait nos journées rien que par sa présence (et ses chants). **Nicolas V.**, tes petits tests sur mes connaissances filmographiques me manquent beaucoup, tes tentatives de me faire avoir une crise cardiaque, moins. Je te souhaite de tout cœur de réussir dans tes études de médecine ! Je remercie également **Lisa**, avec qui j'ai apprécié faire des pauses café quand on avait besoin de respirer un peu ! Enfin, un grand merci à **Mani-Mega, Monica, Nicolas P., Anne-Charlotte, Cyrielle, Fazia, Edmond, Mariem, Cloé, Khadi et Clémence** à qui je souhaite le meilleur pour la suite de leur parcours.

Un grand merci aussi à l'ensemble des membres du **service SERAMED et SESANE**, pour leur gentillesse et leur bienveillance. Merci à **Véronique**, qui a toujours su m'aider lorsque j'étais perdue dans l'enfer de l'administration, merci à **Stéphanie**, pour sa bonne humeur constante et son sourire contagieux. Je remercie **Amine**, pour son aide dans les analyses statistiques, ce domaine de recherche qui restera toujours un mystère pour moi ! Merci également à **Chloé**, de toutes tes petites attentions sucrées et de ton travail toujours impeccable. Je souhaiterais aussi remercier tout particulièrement le **GSEA : Delphine, Amandine, Frédéric, Romain** et

Sébastien pour leur aide à l'animalerie et leur disponibilité lorsque j'avais besoin d'aide et de conseils.

Je n'oublie pas tous les doctorants que j'ai eu la chance de rencontrer durant cette thèse et avec qui j'ai partagé de bons moments : Merci à **Céline S, Alice, Nicolas R, Tiffany, Nadia, Ekoe, Jacques, Alexis, Benjamin, Manon J, Manon B, Valentin, Flomin, Kossi, Hugues, Léo** et **Lucie** ! (J'espère n'avoir oublié personne, merci de me contacter pour toute réclamation).

Une pensée spéciale à **mes parents, mes grands-parents, mes oncles, tantes** et surtout **mes cousines (Emma, Marine et Laeti)** que je remercie pour leur soutien constant et leurs encouragements durant cette aventure. Vous avez toujours cru en moi et j'espère que vous serez fiers de moi d'avoir réussi cette épreuve. Penser à vous m'a énormément aidé à me battre et à donner le meilleur de moi-même pour y arriver.

Enfin, le meilleur pour la fin : **MERCI BEAUCOUP MON AMOUR DE M'AVOIR SUPPORTEE CES DERNIERS MOIS !!** Je sais que je n'ai pas toujours été facile à vivre durant cette dernière année, mais tu es resté patient, tu m'as fait rire, tu m'as aidé à me battre en me donnant des conseils et pour ça, je t'en serai reconnaissante à jamais. Je t'aime.

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 4 |
| Sommaire | 9 |
| Publications et communications | 12 |
| Table des abréviations | 14 |
| Table des figures et tableaux | 16 |
| Avant-propos | 19 |
| Etat de l’art | 23 |
| Chapitre I : Radiothérapie pelvienne – Bénéfices et Risques | 25 |
| I. Anatomie de la zone pelvienne et incidence des cancers pelviens..... | 26 |
| II. Radiothérapie et rayons ionisants..... | 27 |
| A. Principe de la radiothérapie..... | 27 |
| B. Les différentes techniques de radiothérapie..... | 30 |
| C. Association de la radiothérapie avec d’autres thérapies..... | 33 |
| D. Notion d’organes à risque et dose de tolérance..... | 34 |
| III. La Pelvic Radiation Disease..... | 38 |
| A. Atteinte du tissu sain colorectal..... | 38 |
| 1. Fonctions et anatomie de la zone colorectale (tissulaire et cellulaire)..... | 38 |
| a. La muqueuse..... | 39 |
| b. La sous-muqueuse..... | 42 |
| c. La musculieuse..... | 42 |
| d. La séreuse..... | 42 |
| 2. Caractérisation de l’atteinte colorectale radio-induite..... | 43 |
| a. Atteintes cellulaires et tissulaires..... | 43 |
| b. Atteinte inflammatoire..... | 45 |
| c. Inflammation et réparation tissulaire..... | 47 |
| B. Symptômes de l’irradiation colorectale..... | 50 |
| 1. Symptômes aigus..... | 52 |
| 2. Symptômes tardifs..... | 52 |
| IV. Traitements de l’atteinte colorectale radio-induite : Une thérapie actuelle inefficace..... | 53 |
| Chapitre II : Le microbiote intestinal – Fonctions et dysbiose radio-induite | 59 |
| I. Le microbiote intestinal..... | 60 |
| A. Découverte du microbiote..... | 60 |
| B. Le microbiote intestinal humain..... | 62 |

| | |
|--|-----------|
| 1. Définition du microbiote..... | 62 |
| 2. Composition et répartition du microbiote intestinal..... | 62 |
| 3. Fonctions du microbiote intestinal humain..... | 65 |
| a. Activité métabolique du microbiote | 65 |
| b. Protection et maintien de l'effet barrière | 67 |
| c. Développement et fonctionnement du système immunitaire | 69 |
| II. Dysbiose du microbiote intestinal après radiothérapie..... | 77 |
| A. Notion de dysbiose..... | 77 |
| B. Dysbiose après radiothérapie..... | 78 |
| 1. Composition du microbiote après irradiation pelvienne..... | 79 |
| 2. Dysbiose après irradiation : Cause ou conséquence de la pathogenèse ? | 82 |
| 3. Adéquation des modèles animaux dans l'étude de la dysbiose humaine..... | 86 |
| 4. Hypothèses sur la cause de cette dysbiose | 87 |
| III. Agir sur le microbiote pour traiter la PRD..... | 88 |
| A. Transplantation fécale..... | 89 |
| 1. Définition de la transplantation fécale | 89 |
| 2. Utilisation de la transplantation fécale en clinique | 89 |
| 3. Utilisation de la transplantation fécale en pré-clinique | 91 |
| B. Probiotiques | 91 |
| 1. Définition d'un probiotique | 91 |
| 2. Utilisation de probiotiques en clinique..... | 92 |
| 3. Utilisation de probiotiques en pré-clinique | 95 |
| Chapitre III : <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>, un probiotique au fort potentiel thérapeutique..... | 99 |
| I. Caractérisation de la bactérie | 100 |
| A. Caractéristiques, classification et localisation..... | 100 |
| B. Intérêt de <i>F. prausnitzii</i> dans le microbiote intestinal..... | 101 |
| II. Utilisation de <i>F. prausnitzii</i> dans le traitement des MICI..... | 102 |
| A. Actions sur diverses fonctions..... | 102 |
| 1. Maintien du tissu | 102 |
| 2. Perméabilité intestinale..... | 103 |
| 3. Inflammation | 107 |
| B. Mécanismes d'action..... | 109 |
| 1. Métabolites actifs | 109 |
| a. Butyrate..... | 109 |
| b. Microbial Anti-inflammatory Molecule (MAM) | 111 |
| c. Autres métabolites | 112 |

| | |
|--|-----|
| 2. Autres mécanismes d'actions possibles | 114 |
| III. Potentiel thérapeutique de <i>F. prausnitzii</i> dans la PRD | 117 |
| A. Caractéristiques communes entre MICI et PRD | 117 |
| B. Actions potentielles de <i>F. prausnitzii</i> sur les différents niveaux d'atteintes de la PRD | 118 |
| Problématique et objectifs de la thèse | 120 |
| Article et Résultats supplémentaires | 123 |
| Prophylactic <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> treatment prevents acute colonic barrier breakdown in a preclinical model of pelvic radiation disease | 125 |
| Effet de l'administration de <i>F. prausnitzii</i> sur l'ulcération colorectale chronique radio-induite | 157 |
| Effet de l'association de <i>F. prausnitzii</i> et de la thérapie par cellules stromales mésenchymateuses sur le développement d'ulcération colorectale radio-induite | 169 |
| Discussion et perspectives | 183 |
| Avant-propos | 185 |
| Pertinence du modèle expérimental choisi..... | 189 |
| Vers une utilisation thérapeutique clinique de <i>F. prausnitzii</i> | 195 |
| Interactions entre microbiote intestinal et traitement anti-tumoral | 201 |
| Perspectives du traitement de la dysbiose radio-induite clinique | 207 |
| Conclusion générale | 211 |
| Annexes | 215 |
| Influence des facteurs endogènes et exogènes dans l'apparition de la dysbiose intestinale humaine..... | 216 |
| Traitement de la PRD par la thérapie cellulaire | 221 |
| Bibliographie | 235 |

Publications et communications

Publications

Lapiere A, Geiger M, Robert V, Demarquay C, Auger S, Fernandes G, Milliat F, Langella P, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Prophylactic *Faecalibacterium prausnitzii* treatment prevents acute colonic barrier breakdown in a preclinical model of pelvic radiation disease. Soumis

Moussa L, **Lapiere A**, Squiban C, Demarquay C, Milliat F, Mathieu N. BMP-antagonists secreted by mesenchymal stromal cells improve colonic organoids formation: Innovation in cell therapy treatment. Soumis

Communications orales

Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite – Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Colloque Microbiote et Santé, Faculté de Médecine Paris Sud, Kremlin-Bicêtre, France (Novembre 2017)

Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite – Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Radioprotection : Quelles innovations, quel avenir ? Société Française de Radioprotection – Jeunes Sociétaires, Paris, France (Avril 2018)

Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite - Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie, Paris, France (Juin 2018)

Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite - Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives, Toulouse, France (Mars 2019)

Lapiere A, Geiger M, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. *Faecalibacterium prausnitzii* treatment reduces radiation-induced colorectal injury : Application to the management of pelvic radiotherapy complications, International Probiotic Congress, Prague, République Tchèque (Juin 2019)

Lapiere A, Geiger M, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. *Faecalibacterium prausnitzii* treatment reduces radiation-induced colorectal injury : Application to the management of pelvic radiotherapy complications, International Congress of Radiation Research, Manchester, Angleterre (Août 2019)

Communications affichées

Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite - Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Société Française de Radiothérapie Oncologique, Paris (Octobre 2018)

Prix et Distinctions

Journée de la recherche - Prix de la communication orale 2017 : Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite –Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Colloque Microbiote et Santé, Faculté de Médecine Paris Sud, Kremlin-Bicêtre, France (Novembre 2017)

Prix Jeune Chercheur : Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite - Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie, Paris, France (Juin 2018)

Prix Meilleur Poster : Lapiere A, Demarquay C, Robert V, Chatel JM, Sémont A. Etude de l'effet de *Faecalibacterium prausnitzii* pour prévenir l'apparition d'ulcération colique radio-induite - Application dans la prise en charge des complications après radiothérapie abdomino-pelvienne, Société Française de Radiothérapie Oncologique, Paris (Octobre 2018)

Young Scientist Award : Lapiere A, Geiger M, Demarquay C, Robert V, Benderitter M, Chatel JM, Sémont A. *Faecalibacterium prausnitzii* treatment reduces radiation-induced colorectal injury : Application to the management of pelvic radiotherapy complications, International Probiotic Congress, Prague, République Tchèque (Juin 2019)

Table des abréviations

| | |
|---------|--|
| 5-ASA | 5 Amino-Salicylic Acid |
| ad-CSM | Cellule Stromale Mésoenchymateuse adipeuse |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADN CpG | Acide Désoxyribonucléique Cytosine-phosphate-Guanine |
| AGCC | Acide Gras à Chaîne Courte |
| Ahr | Aryl Hydrocarbon |
| BAFF | B-cell Activating Factor |
| BM-CSM | Cellule Stromale Mésoenchymateuse de moelle osseuse |
| CD | Cellule Dendritique |
| CFU | Colony Forming Unity |
| COX2 | Cyclooxygénase 2 |
| CSM | Cellule Stromale Mésoenchymateuse |
| CTCAE | Common Terminology Criteria for Adverse Events |
| CXCL13 | CXC-Chemokine Ligand 13 |
| DNBS | DinitroBenzene Sulfonic Acid |
| DSS | Dextran Sodium Sulfate |
| ERO | Espèce Réactive à l'Oxygène |
| ESCMID | European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease |
| FGF2 | Fibroblast Growth Factor |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate |
| GM | Ganglions mésoentériques |
| GPR | G Protein-Coupled Receptor |
| Gy | Gray |
| HDAC1 | Histone Deacetylase 1 |
| HDV | Histogramme Dose Volume |
| HES | Hématoxyline Eosine Safran |
| IBD | Inflammatory Bowel Disease |
| IBS | Irritable Bowel Syndrome |
| IFN | Interféron |
| IgA | Immunoglobuline A |
| IL | Interleukine |
| ILC | Innate Lymphoid Cell |
| iNOS | Inducible Nitric Oxyde Synthase |
| IRM | Imagerie par Résonance Magnétique |
| ISA | Isopropylidene Shikimic Acid |
| IV | Intra Veineuse |
| JAM | Junctional Adhesion Molecule |
| kDa | Kilo Dalton |
| LB | Lymphocyte B |
| LPS | Lipopolysaccharide |

| | |
|-----------|--|
| LT | Lymphocyte T |
| Ltreg | Lymphocyte T régulateur |
| M1 | Macrophage type 1 |
| M2 | Macrophage type 2 |
| MAM | Molécule Anti-Microbienne |
| MICI | Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin |
| MPO | Myeloperoxydase |
| NCI | National Cancer Institute |
| NF-kB | Nuclear Factor Kappa B |
| NLRP3 | NOD-, LRR- and Pyrin domain-containing protein 3 |
| NOS | Nitric Oxyde Synthase |
| NTCP | Normal Tissue Complication Probability |
| OAR | Organe à Risque |
| ORL | Oto-Rhino-Laryngologie |
| PAMP | Pathogen-associated Molecular Pattern |
| PD-CSM | Cellule Stromale Mésoenchymateuse dérivée du placenta |
| PRD | Pelvic Radiation Disease |
| pTreg | Lymphocyte T régulateur périphérique |
| RCH | Rectocolite Hémorragique |
| RegIII | Regenerating Gene Family Protein 3 |
| RIT | Radio-Immuno Thérapie |
| RORyt | Retinoic-acid-receptor-related Orphan nuclear Receptor gamma |
| ROS | Reactive Oxygen Specy |
| RT-qPCR | Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| SFB | Segmented Filamentous Bacteria |
| SOMA-LENT | Subjective, Objective, Management, Analytic - Late Effects Normal Tissue |
| SOX9 | SRY-Box Transcription Factor 9 |
| TD | Total Dose |
| TEP | Tomographie par Emission de Positons |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TLR | Toll-Like Receptor |
| TMF | Transplantation de Matière Fécale |
| TNBS | TrinitroBenzene Sulfonic Acid |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| tTreg | Lymphocyte T régulateur du thymus |
| UC-CSM | Cellule Stromale Mésoenchymateuse de cordon ombilical |
| UV | Ultra-Violet |
| WNT | Wingless Integration Site |

Table des figures et tableaux

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Anatomie de la cavité pelvienne..... | 27 |
| Figure 2 : Principe de la radiothérapie externe | 30 |
| Figure 3 : Cycle de la division cellulaire | 33 |
| Figure 4 : Représentation de la tomothérapie..... | 34 |
| Figure 5 : Représentation du Cyberknife | 38 |
| Figure 6 : Représentation de la protonthérapie | 32 |
| Figure 7 : Représentation des architectures parallèle et sérielle | 35 |
| Figure 8 : Anatomie de la zone colorectale et position dans la cavité pelvienne | 38 |
| Figure 9 : Caractérisation des couches composant les parois colique et rectale | 39 |
| Figure 10 : Schématisation des types cellulaires présents dans la crypte colique | 40 |
| Figure 11 : Fonctions des tuft cells dans la réponse aux parasites Helminth et aux protozoaires | 42 |
| Figure 12 : Schématisation de la cascade des dommages radio-induits sur la muqueuse intestinale..... | 44 |
| Figure 13 : Différenciation des lymphocytes T et cytokines associées..... | 46 |
| Figure 14 : Ambivalence de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation intestinale et l'intégrité de la barrière épithéliale | 48 |
| Figure 15 : Caractérisation et terminologie des troubles gastro-intestinaux associés à des effets secondaires par le CTCAE..... | 51 |
| Figure 16 : Représentations sculpturales et graphiques de l'utilisation du lavement rectal dans les cultures ancestrales..... | 60 |
| Figure 17 : « Médicaments microbiens » par E. Metchnikoff, microscope de Van Leeuwenhoek et dessins des « animalcules » par Van Leeuwenhoek | 61 |
| Figure 18 : Schéma de la phylogénétique bactérienne | 63 |
| Figure 19 : Concentrations bactériennes dans les organes du tractus gastro-intestinal | 38 |
| Figure 20 : Métabolisme du microbiote intestinal | 50 |
| Figure 21 : Implication du microbiote dans le maintien d'une barrière efficace | 68 |
| Figure 22 : Implication du microbiote dans le développement et le fonctionnement des cellules du système immunitaire inné | 72 |
| Figure 23 : Implication du microbiote dans le développement et le fonctionnement des cellules du système immunitaire adaptatif | 75 |
| Figure 24 : Les différents phénomènes de dysbiose..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figure 25 : Hypothèses sur le rôle de la dysbiose dans la pathogenèse | 83 |
| Figure 26 : Hypothèse d'une similarité plus proche du microbiote des humains et du rat | 87 |
| Figure 27 : Principe de la transplantation fécale | 90 |
| Figure 28 : Arbre phylogénétique de la bactérie <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | 100 |
| Figure 29 : Une hypothèse de classification des différentes souches connues de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | 100 |
| Figure 30 : Inhibition de l'enzyme HDAC1 par le butyrate produit par la <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> et effets anti-inflammatoires associés | 111 |
| Figure 31 : Observation de la fluorescence induite par luciférase lors de l'activation de la voie NF- κ B et effet anti-inflammatoire de la MAM | 112 |
| Figure 32 : Décomposition de l' α -cétoglutarate dans l'organisme | 114 |
| Figure 33 : Schématisation des interactions entre <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> et d'autres bactéries commensales du microbiote intestinal humain..... | 116 |
| Figure 34 : Représentation schématique de l'effet potentiel de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> sur les altérations colorectales radio-induites..... | 119 |
| Figure 35 : Schéma récapitulatif des problématiques à résoudre pour optimiser le traitement par <i>F. prausnitzii</i> dans la prise en charge des effets secondaires colorectaux de la radiothérapie pelvienne et envisager un transfert clinique du traitement..... | 214 |
| Figure 36 : Représentations schématiques de 4 causes exogènes de dysbiose intestinale humaine..... | 219 |
| Tableau 1 : Les cancers en France..... | 27 |
| Tableau 2 : Caractérisation architecturale des organes de la cavité pelvienne | 38 |
| Tableau 3 : Doses (Gy) correspondant à un risque de complications de 5% (TD5/5) et 50% (TD50/5) à 5 ans selon le volume irradié (1/3, 2/3 ou totalité de l'organe)..... | 37 |
| Tableau 4 : Doses de tolérance des principaux organes à risque et des tissus sains | 34 |
| Tableau 5 : Traitements existants contre les effets secondaires colorectaux de la radiothérapie pelvienne | 56 |
| Tableau 6 : Liste des études cliniques utilisées dans cette analyse de la dysbiose radio-induite | 79 |
| Tableau 7 : Modification du microbiote chez les patients traités par radiothérapie pelvienne | 80 |
| Tableau 8 : Modification du microbiote chez les patients traités par radiothérapie pelvienne et souffrant d'entérite radique | 81 |
| Tableau 9 : Utilisation clinique de probiotiques dans le cadre de lésions colorectales induites par radiothérapie pelvienne..... | 93 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 10 : Utilisation pré-clinique de probiotiques dans le cadre de lésions colorectales induites par radiothérapie pelvienne..... | 95 |
| Tableau 11 : Utilisation pré-clinique de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> dans le cadre de MICI | 105 |
| Tableau 12 : Modification des cytokines secrétées localement et dans le système sanguin par le traitement avec <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> et/ou son surnageant..... | 107 |
| Tableau 13 : Utilisation clinique des CSM dans le cas de la maladie de Crohn fistulisée | 223 |
| Tableau 14 : Utilisation clinique des CSM dans le cas des MICI luminales..... | 224 |
| Tableau 15 : Utilisation pré-clinique des CSM dans le cas de lésions intestinales et colorectales radio-induites..... | 228 |
| Tableau 16 : Modification de la sécrétion de cytokines par l'injection de CSM..... | 231 |

Avant-propos

Le développement de la méthode de radiothérapie a été une révolution dans le domaine de la médecine, permettant de traiter plus efficacement des cancers jusqu'alors difficile à éradiquer, grâce à sa capacité à traiter localement les tumeurs. De nos jours, les techniques de radiothérapie permettent un excellent contrôle tumoral et continuent à évoluer afin d'augmenter leur efficacité anti-tumorale. Néanmoins, la radiothérapie comporte des risques. En effet, les rayonnements ionisants peuvent également atteindre des tissus sains environnant la tumeur, induisant une perte de fonctionnalité d'organes vitaux. Etablir un équilibre entre contrôle tumoral et diminution de l'atteinte des tissus sains est alors un challenge important pour les cliniciens. Malgré les efforts mis en œuvre pour diminuer l'atteinte des organes sains par les rayons, ils sont généralement touchés et conduisent à l'apparition de symptômes pouvant fortement diminuer la qualité de vie des patients. Dans le cas de l'utilisation de la radiothérapie pour un cancer situé dans la zone pelvienne, les patients développent généralement des symptômes liés à l'atteinte des tissus colorectaux par les rayonnements ionisants. Ces symptômes sont associés à différents phénomènes, comme la perte de renouvellement de la muqueuse colorectale ainsi que le déclenchement d'une inflammation. Le nombre grandissant de patients atteints par ces symptômes, durant la radiothérapie ou après la fin de la radiothérapie, a donné lieu à la définition d'une nouvelle pathologie, la Pelvic Radiation Disease, afin de permettre une meilleure prise en charge de ces patients. Il devient alors nécessaire de trouver des stratégies thérapeutiques efficaces pour diminuer ou prévenir les atteintes des organes sains environnant la tumeur. Récemment, un nouveau phénomène a été associé à l'apparition de ces symptômes colorectaux, un changement dans la composition du microbiote bactérien du côlon. Cette découverte amène un nouvel élément dans la recherche de méthodes de traitements innovantes pour diminuer les symptômes colorectaux radio-induits. En effet, le microbiote peut être modifié par l'administration d'antibiotiques, de probiotiques et autres traitements impliqués dans la modulation des populations bactériennes. Ainsi, de nombreuses études cliniques et pré-cliniques ont démontré l'intérêt d'administrer des probiotiques pour empêcher l'apparition de symptômes liés à la toxicité colorectale radio-induite.

Le laboratoire de recherche en radiobiologie des expositions médicales a pour but d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'initiation et le développement des lésions aux tissus sains induites par l'exposition aux rayonnements ionisants dans le cadre médical et de rechercher des méthodes thérapeutiques efficaces et innovantes pour prévenir ou traiter ces lésions. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'une

bactérie particulière en tant que probiotique pour prévenir le développement des lésions colorectales radio-induites. Cette bactérie se nomme *Faecalibacterium prausnitzii* et possède des propriétés thérapeutiques intéressantes, qui pourraient être efficaces dans le maintien d'un côlon sain lors d'une radiothérapie pelvienne. Pour étudier son efficacité thérapeutique, nous avons procédé à des études *in vivo* sur un modèle expérimental d'irradiation colorectale à court et long terme. Ces deux temps d'analyse nous permettent d'analyser l'effet de l'administration sur des lésions aiguës et sub-aiguës, pouvant s'apparenter à celles observées chez les patients atteints de Pelvic Radiation Disease. Ce projet de thèse nous permet d'étudier la capacité de ce probiotique à traiter ces deux types d'atteintes et ainsi, évaluer l'intérêt de son utilisation en clinique chez les patients traités par radiothérapie pelvienne.

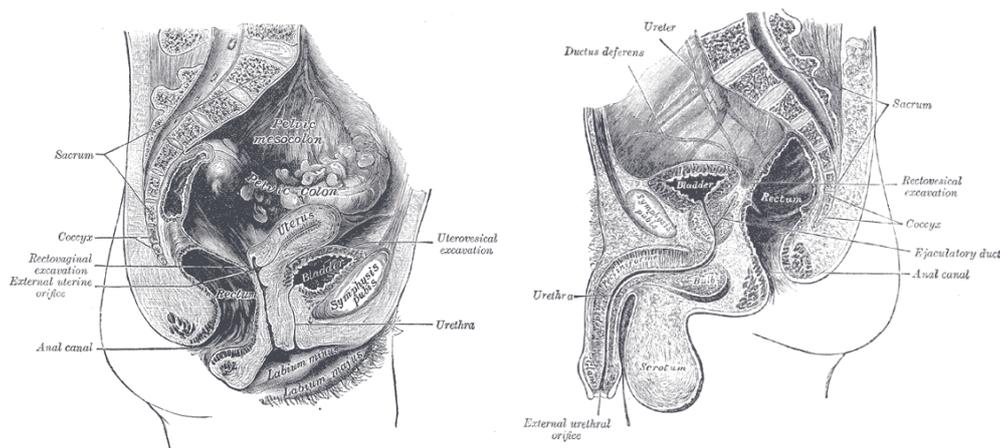
ETAT DE L'ART

CHAPITRE I

Radiothérapie pelvienne : Bénéfices et risques

I. Anatomie de la zone pelvienne et incidence des cancers pelviens

La cavité pelvienne renferme plusieurs organes qui se superposent. Ces différents organes peuvent être subdivisés en trois groupes, chaque groupe remplissant des fonctions spécifiques : l'appareil digestif (côlon sigmoïde, rectum et anus), l'appareil urinaire (vessie) et l'appareil reproducteur (prostate chez l'homme, vagin, utérus et ovaires chez la femme). À la suite d'un dysfonctionnement cellulaire, ces organes peuvent développer des cancers.



**Figure 1 : Anatomie de la cavité pelvienne
(Henry Gray, *Anatomy of the Human Body*, 1918)**

En 30 ans, le nombre de cancers a doublé, et depuis 2004, le cancer est la première cause de mortalité prématurée en France. En 2018, en France, 382 000 cancers étaient diagnostiqués, dont 124 000 (environ 32%) concernaient un organe de la sphère pelvienne¹. Le cancer de la prostate, colorectal et de la vessie étaient les cancers pelviens les plus fréquents avec respectivement 13,20%, 11,40% et 3,42% des patients atteints de cancers (Voir tableau 1)¹.

Pour traiter ces différents cancers, plusieurs types de traitements existent. La chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie sont les plus fréquents et sont souvent combinés pour augmenter le contrôle tumoral. La radiothérapie est proposée aux patients dans le cadre d'un traitement pour la plupart de ces cancers (rectum, prostate, vessie, vagin et utérus). Trois objectifs principaux définissent son utilisation : la réduction de la taille de la tumeur, la destruction des cellules cancéreuses et dans certains cas, la maîtrise des symptômes.

| | Incidence | | Mortalité | |
|--------------|----------------|--------------|---------------|--------------|
| | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage |
| Prostate | 50 430 | 13,20 | 8 115 | 5,15 |
| Côlon-rectum | 43 569 | 11,40 | 17 117 | 10,87 |
| Côlon | 27 814 | 7,28 | - | - |
| Rectum | 13 744 | 3,60 | - | - |
| Anus | 2 011 | 0,52 | - | - |
| Vessie | 13 074 | 3,42 | 5 335 | 3,38 |
| Utérus | 11 144 | 2,91 | 3 532 | 2,24 |
| Col | 2 920 | 0,76 | - | - |
| Corps | 8 224 | 2,15 | - | - |
| Ovaire | 5 193 | 1,35 | 3 479 | 2,21 |
| Vulve | 838 | 0,21 | - | - |
| Vagin | 162 | 0,04 | - | - |
| TOTAL | 124 410 | 32,56 | 41 110 | 23,85 |

Tableau 1 : Incidence et mortalité des cancers de la zone pelvienne en France (2019)¹

II. Radiothérapie et rayons ionisants

A. Principe de la radiothérapie

A la suite du diagnostic du patient par le médecin oncologue, la radiothérapie peut lui être proposée. L'oncologue radiothérapeute, le physicien ainsi que le dosimétriste vont établir ensemble le plan de traitement optimal pour le patient, en fonction du type de tumeur, de son évolution et de l'état général du patient. Le plan de traitement aide à déterminer la répartition de la dose de rayonnements à délivrer dans la zone à traiter. Ce plan s'établit sur deux critères : la dose totale de rayons reçue par le patient, exprimée en Gray (Gy), qui correspond à l'énergie de 1 Joule absorbée dans une masse de 1kg de matière, et la modalité de délivrance de cette dose, c'est-à-dire la dose délivrée par séance (le fractionnement) ainsi que le nombre et la fréquence de séances à planifier.

Le normofractionnement est une planification des séances de radiothérapie fréquemment utilisée. Il consiste à délivrer au patient une dose de 1,8 à 2Gy, une fois par jour, environ 5 jours par semaine et pendant plusieurs semaines jusqu'à atteindre la dose totale qui lui a été prescrite. D'autres types de fractionnement existent, comme l'hypofractionnement, qui consiste à diminuer le nombre de séances en augmentant la dose délivrée par fraction.

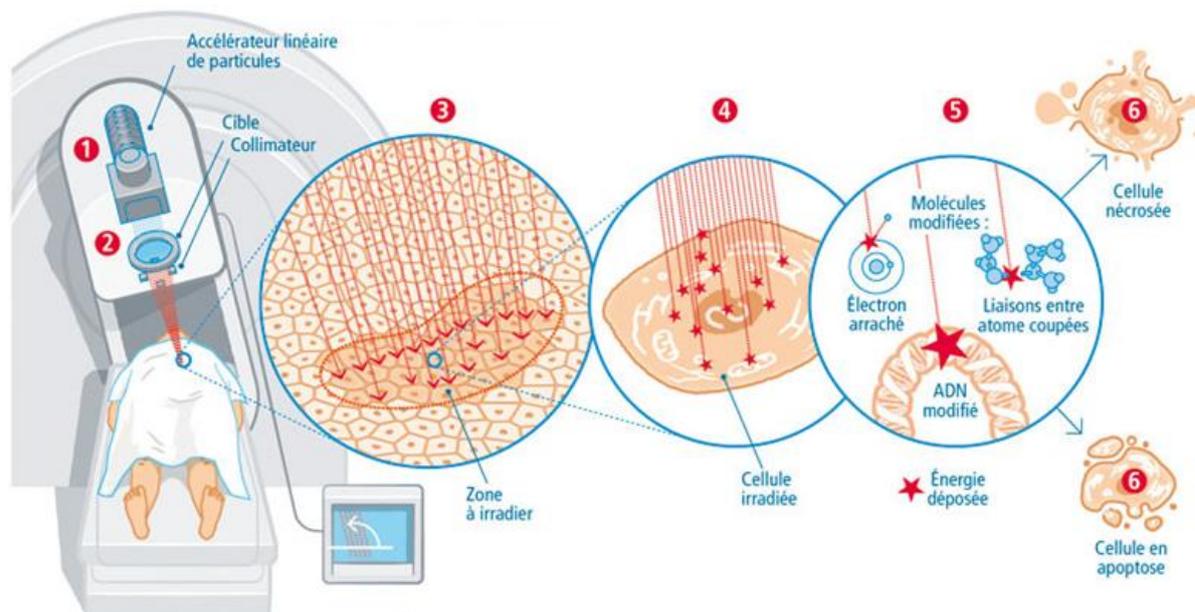


Figure 2 : Principe de la radiothérapie externe ²

La radiothérapie externe est une technique locorégionale de traitement de la tumeur, elle est la plus couramment utilisée de nos jours pour traiter un cancer de la zone pelvienne. Elle utilise un accélérateur linéaire de particules qui va accélérer des électrons pour les bombarder sur une cible en tungstène (1 et 2, figure 2). La cible en tungstène freine les électrons et va générer des photons, c'est-à-dire des faisceaux d'énergie, également appelés rayons X. Ces rayons générés vont ensuite être modulés, en passant à travers un collimateur, qui va permettre de donner une forme spécifique aux faisceaux. La forme choisie est personnalisée en fonction de la tumeur, l'ouverture permet donc de suivre spécifiquement les contours de la tumeur traitée (3, figure 2). L'irradiation va provoquer des modifications sur les molécules comme les lipides, les protéines et l'ADN. Ces modifications, comme la dissociation des atomes et les cassures sur les brins d'ADN, vont fortement altérer le fonctionnement des cellules irradiées (4 et 5, figure 2). Ces dysfonctionnements, s'ils ne sont pas réversés par les mécanismes de réparation cellulaire, vont conduire à la nécrose ou à l'apoptose des cellules, qui vont donc être détruites (6, figure 2).

Lorsqu'une cellule est en phase de division (Phases G2 et M, voir figure 3), son ADN est sous forme déroulée. C'est durant cette phase que l'ADN est exposé et peut plus facilement subir des dommages. Les cellules cancéreuses sont dites néoplasiques, ce qui signifie qu'elles prolifèrent anormalement et sont capables de se diviser à l'infini, elles sont plus souvent susceptibles de se trouver en phase de division cellulaire et présentent ainsi une forte

sensibilité aux rayons ionisants. L'utilisation des rayonnements ionisants, en bloquant la survie et la prolifération des cellules cancéreuses, permet donc d'empêcher leur multiplication et de détruire la tumeur.

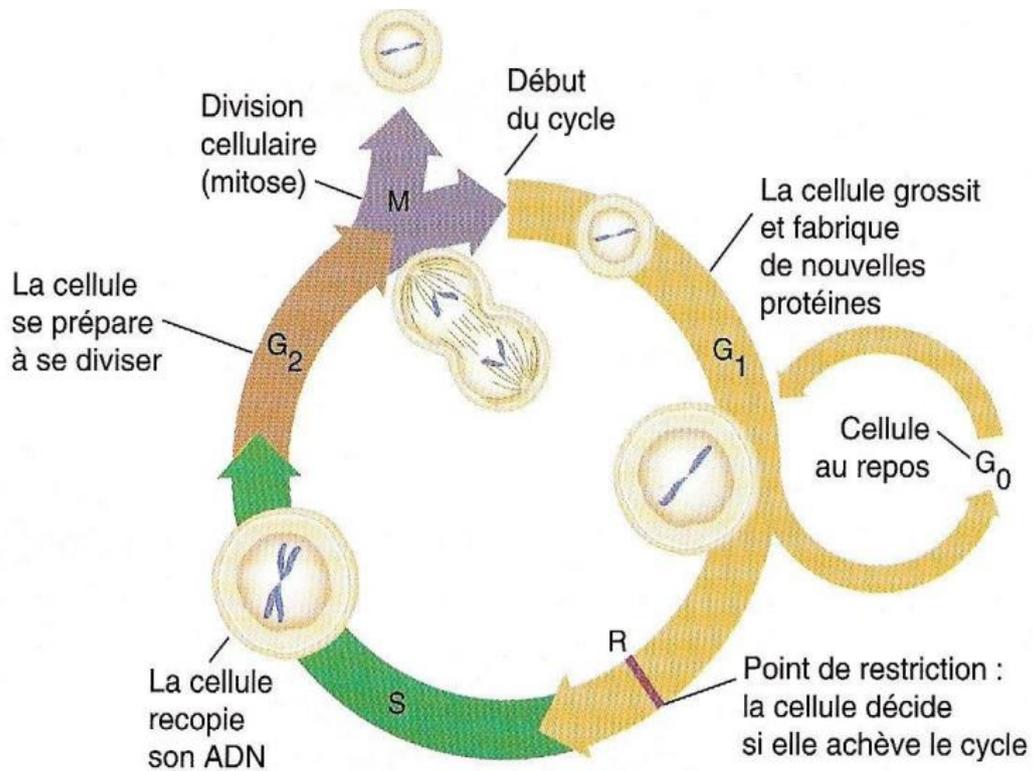


Figure 3 : Cycle de division cellulaire

Les tissus sains possèdent en général une meilleure capacité de réparation des lésions cellulaires que les cellules tumorales, le principe de la radiothérapie et du fractionnement des doses reposent sur cette capacité différentielle entre les cellules saines et tumorales. En étalant les doses délivrées dans le temps, les cellules saines ont la possibilité de récupérer après l'irradiation, tandis que les cellules tumorales n'ont pas le temps de reprendre leur croissance. Le plan de traitement doit donc prendre en compte le temps de récupération des tissus sains pour limiter tout effet secondaire et permettre la destruction de tumeur.

Plusieurs méthodes de radiothérapie (externe ou interne) existent, chacune possédant des caractéristiques spécifiques. Le type de radiothérapie utilisé pour traiter le patient va être choisi en fonction de la localisation de la tumeur, de son évolution ainsi que de l'état général du patient.

B. Les différentes techniques de radiothérapies

Il existe deux types de radiothérapies : La radiothérapie externe, et la radiothérapie interne. Plusieurs types de rayons peuvent être utilisés, chaque type de rayons pénétrant plus ou moins dans le corps et déposant l'énergie de manières différentes. Les rayons les plus utilisés sont les photons, également appelées rayons X, qui sont utilisés dans 90% des protocoles. La protonthérapie, utilisant des protons, est plus rarement utilisée, et les ions carbone sont en cours d'évaluation pour leur application clinique.

Dans le cadre d'un traitement d'un cancer de la zone pelvienne, plusieurs techniques de radiothérapie externe peuvent être utilisées :

- **Radiothérapie conformationnelle 3D** : Cette méthode de radiothérapie est la plus utilisée de nos jours. L'intervention est assistée par des images 3D de la tumeur et des organes voisins, obtenues par scanner, IRM et/ou TEP. Des logiciels de simulation virtuelle 3D permettent de planifier l'irradiation, de visualiser les faisceaux, le volume d'irradiation ainsi que la distribution des doses. Le volume irradié doit correspondre au mieux au volume de la tumeur, tout en épargnant au maximum les tissus sains environnants. Pour cela, 4 à 6 orientations de faisceaux peuvent être utilisées pour adapter la forme du champ d'irradiation à la forme de la tumeur, grâce à l'aide de caches spécifiques.
- **Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité** : La forme du faisceau varie durant la séance de radiothérapie, ce qui fait varier le débit de dose délivrée du faisceau. Le collimateur utilisé possède plusieurs lames qui se déplacent, la tumeur peut donc être ciblée avec une dose optimale. Cette technique permet d'adapter précisément le volume d'irradiation pour protéger le tissu sain, mais également dans le cas de tumeur possédant des creux ou des concavités.
- **Radiothérapie guidée par l'image** : Un dispositif radiologique est intégré à l'accélérateur linéaire de particules, la position exacte de la tumeur est donc contrôlée durant chaque séance de rayons.
- **Radiothérapie stéréotaxique** : Cette technique permet un traitement de haute précision grâce à l'utilisation de mini-faisceaux de photons convergents. Elle permet de délivrer de fortes doses de rayonnements (6 à 20Gy) à de très petits volumes tumoraux, en dose unique ou en petit nombre de fractions. L'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique permet

l'application d'une dose « ablatrice », c'est-à-dire permettant l'ablation de la tumeur. Ainsi, cette méthode de radiothérapie est une bonne alternative thérapeutique pour les patients inopérables ou refusant la chirurgie. La radiothérapie stéréotaxique fractionnée, c'est-à-dire répartie en plusieurs séances d'irradiation, est également en développement pour traiter des volumes plus importants. La radiothérapie stéréotaxique peut être associée à d'autres dispositifs technologiques afin d'améliorer son efficacité thérapeutique :

- Tomothérapie : Association d'un scanner et d'un accélérateur de particule miniaturisé. Le système tourne autour du patient en formant une spirale, ce mouvement est associé à un déplacement longitudinal de la table de radiologie où se trouve le patient (figure 4). La dose est délivrée de manière hélicoïdale, elle est adaptée de manière optimale à la tumeur. De plus, l'ouverture du collimateur varie durant l'irradiation, permettant une modulation de l'intensité.

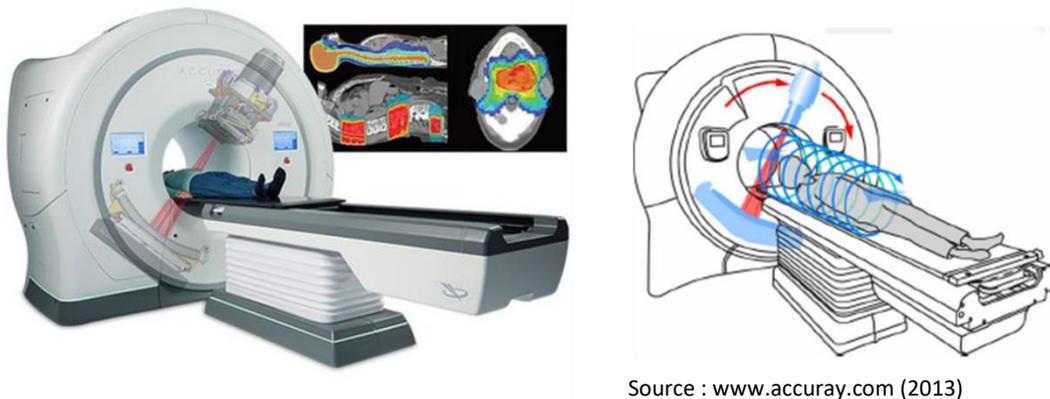


Figure 4 : Représentation de la tomothérapie

- Cyberknife : Il s'agit d'un système de radiochirurgie robotisée. L'accélérateur linéaire est tenu par un robot pouvant se déplacer dans toutes les directions (figure 5). Ce dispositif peut traiter des tumeurs dans tout le corps en 2 à 5 séances d'irradiation. Le robot est associé à un guidage par imagerie médicale et est assisté par ordinateur. Les faisceaux générés sont petits, peuvent être multipliés quasiment à l'infini et varient les angles de tir. Ces caractéristiques permettent de focaliser la zone à irradier en minimisant l'impact sur les tissus sains voisins au maximum. L'exactitude sub-millimétrique de ce système le rend capable de détecter, de suivre et de corriger les déplacements de la tumeur du patient tout au long de son traitement.



Figure 5 : Représentation du Cyberknife

- **Protonthérapie :** A la différence des autres types de radiothérapie, cette technique utilise un faisceau de protons, et non pas de photons. Elle permet de réduire la dose délivrée dans les tissus sains traversés avant la tumeur et de ne pas irradier les tissus derrière la tumeur (figure 6). C'est pour cette raison que cette méthode est indiquée dans le traitement de tumeur à fortes contraintes balistiques et radiobiologiques, comme les cancers du cerveau. Cependant, plusieurs essais cliniques sont en cours aux Etats-Unis pour l'application de la protonthérapie dans le traitement du cancer de la prostate et les résultats semblent démontrer son efficacité dans le contrôle tumoral.

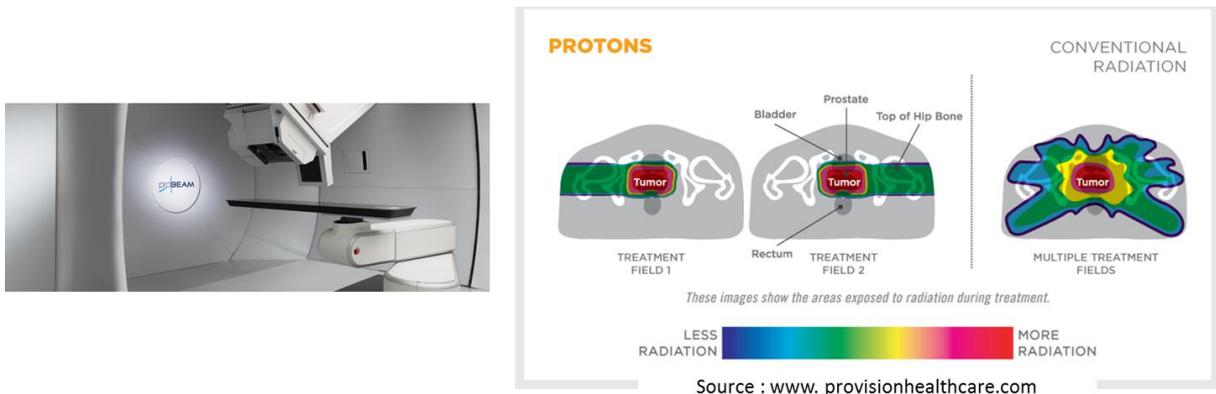


Figure 6 : Représentation de la protonthérapie

La radiothérapie interne est la première forme de radiothérapie découverte, avec l'utilisation de radium pour traiter les tumeurs gynécologiques. Le principe de cette méthode est basé sur l'utilisation de sources radioactives, qui vont émettre des rayonnements courts (α et β), directement sur la tumeur. La dose délivrée et le débit de dose sont élevés pour un faible volume, permettant d'épargner au maximum les tissus sains. Cette technique de

radiothérapie est applicable dans le cadre d'un traitement d'un cancer en région pelvienne, tels que les cancers gynécologiques ou de la prostate, en voici différents types :

- **Curiethérapie** : Introduction d'éléments radioactifs dans ou à proximité de la tumeur. Pour le traitement d'un cancer de la prostate par exemple, la source radioactive utilisée est l'iode 125. En fonction de la nature et de la localisation de la tumeur, différentes méthodes de curiethérapie existent :
 - Curiethérapie endocavitaire : Introduction d'un tube, ou fourreau, dans la zone tumorale. Ce tube est ensuite chargé avec une source radioactive. L'applicateur est retiré en fin de traitement.
 - Curiethérapie interstitielle à chargement différé : Insertion de petits tubes synthétiques directement dans la tumeur, qui sont ensuite chargés radioactivement. Les tubes sont retirés en fin de traitement.
 - Curiethérapie interstitielle avec implants permanents : Insertion d'aiguilles creuses contenant des grains d'iode radioactif dans la zone tumorale. Pendant plusieurs semaines, de petites doses de rayonnements sont libérées. L'intensité des sources diminue au fil du temps.

- **Radiothérapie interne vectorisée ou radiothérapie métabolique** : Il s'agit d'un médicament porteur d'un élément radioactif qui va être administré par voie veineuse ou orale. Également appelés radiopharmaceutiques, ils vont cibler spécifiquement les cellules tumorales. La radio-immunothérapie (RIT), qui fait partie de ce type de radiothérapie interne, associe un anticorps anti-tumoral à un élément radioactif, permettant un ciblage de la tumeur encore plus précis. Parmi les traitements de RIT on retrouve l'yttrium 90 et le lutétium 177 (émetteurs β) qui peuvent être utilisés dans le cadre d'un traitement d'un cancer de la prostate. Le plomb 212 et le thorium 227, des émetteurs α , sont également utilisables en RIT pour ce type de cancer.

C. Association de la radiothérapie avec d'autres thérapies

L'utilisation de la radiothérapie peut être faite en simultanée avec un acte chirurgical :

- **Radiothérapie néo-adjuvante ou pré-opératoire** : Effectuée avant une chirurgie, elle permet de réduire la taille de la tumeur et facilite ainsi son retrait.

- **Radiothérapie adjuvante ou post-opératoire** : Effectuée après une intervention chirurgicale, elle permet de s'assurer qu'aucune cellule tumorale ne persiste en détruisant les possibles cellules cancéreuses restantes. La radiothérapie est donc utilisée ici afin de diminuer le risque de récurrence.
- **Radiothérapie peropératoire** : Utilisation de la radiothérapie au cours de l'intervention chirurgicale. Cette technique permet une exposition directe de la tumeur ou de la zone où se trouvait la tumeur à une dose unique et élevée de rayons ionisants, réduisant ainsi l'irradiation des tissus sains.

Il est également possible d'associer la radiothérapie à une chimiothérapie, dans le but d'augmenter l'efficacité des rayons sur les cellules cancéreuses. Cette association, nommée radiochimiothérapie concomitante, s'appuie sur l'utilisation de médicaments radiosensibilisants qui vont rendre les cellules cancéreuses plus sensibles à la radiothérapie.

Si la radiothérapie a démontré son efficacité dans le traitement des cancers pelviens, elle a cependant également démontré une toxicité pour les tissus sains environnants la tumeur. En effet, bien que les cliniciens essayent de limiter au maximum l'atteinte par les rayonnements des tissus sains environnants la tumeur, il peut survenir des effets secondaires suite à l'irradiation de la zone pelvienne. Ces effets secondaires sont notamment dus à la présence d'organes radiosensibles dans cette région, également appelés organes à risque.

D. Notion d'organes à risque et dose de tolérance

En irradiant la tumeur, les organes voisins se trouvant dans la zone irradiée peuvent être atteints par les rayons. Ce tissu normal peut montrer une sensibilité aux rayonnements ionisants, de par leur renouvellement rapide. Ces organes sont qualifiés d'organes à risque (OAR) et sont la cause du développement d'effets secondaires de la radiothérapie³. L'évaluation des risques d'irradiation de ces organes est une étape essentielle dans l'élaboration et l'optimisation du plan de traitement.

Il existe actuellement trois classes d'OAR définis et classés selon leur criticité :

- Classe 1 : Organe critique, de graves lésions sur ce type d'organe peuvent entraîner la mort ou une morbidité sévère (tronc cérébral, cœur...)
- Classe 2 : Organe à risque dont des lésions peuvent entraîner une morbidité modérée à faible (intestin, poumon)

- Classe 3 : Organe à risque donc des lésions peuvent conduire à une morbidité transitoire ou pas de morbidité.

Cette notion d'OAR a démontré la nécessité d'établir une dose et un volume d'irradiation seuil, également nommée « dose de tolérance » qui constitue la dose maximale de rayonnements ionisants à atteindre sur un organe sain. Cette dose fait face à la « dose de contrôle tumoral », c'est-à-dire la dose nécessaire pour obtenir une stérilisation locale définitive de la tumeur dans 90% des cas.

Pour établir la dose de tolérance d'un organe sain, il faut prendre en compte plusieurs paramètres. L'architecture de l'organe détermine sa tolérance fonctionnelle³. L'organe est constitué de sous-unités et possède une structure spécifique (figure 7 et tableau 2).

- **Structure en série** (intestin, moelle épinière...) : La destruction d'une sous-unité altère toute la fonction de l'organe.
- **Structure en parallèle** (poumon, rein, vessie, foie...) : Les sous-unités sont indépendantes entre elles, la fonction de l'organe est altérée lorsqu'un certain nombre de sous-unités sont atteintes.

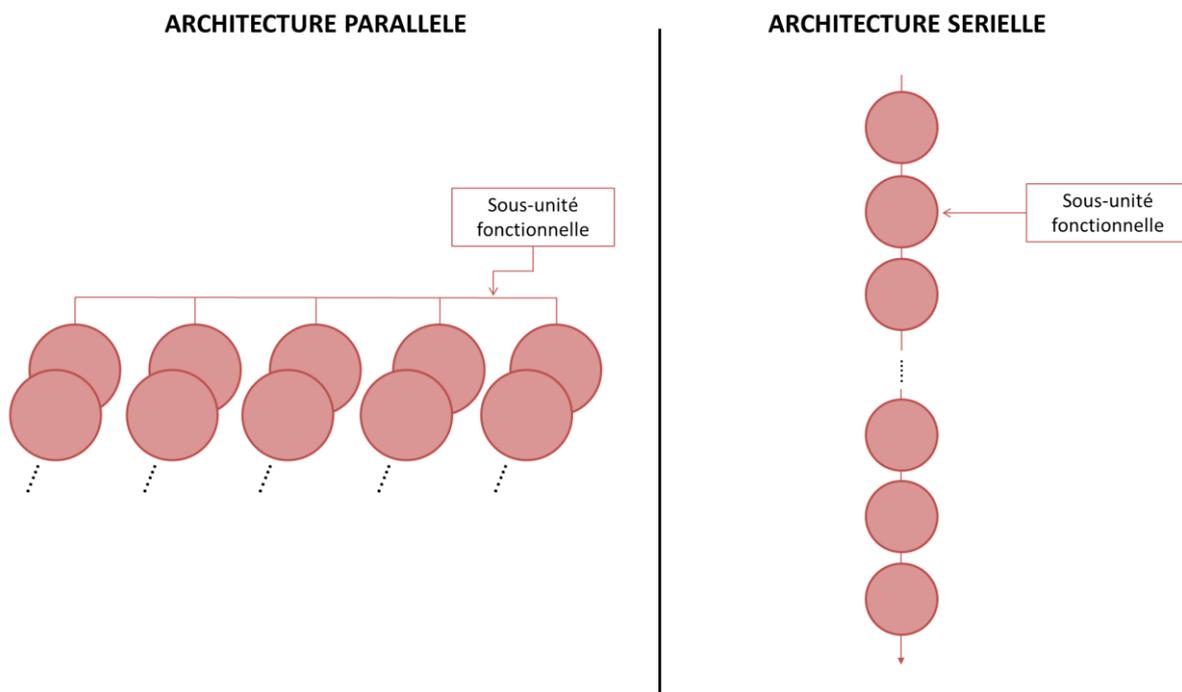


Figure 7 : Représentation des architectures parallèle et série

| Organe à risque | Architecture fonctionnelle |
|-----------------|----------------------------|
| Côlon | Série |
| Canal anal | Série ou parallèle |
| Ovaires | Parallèle |
| Rectum | Série ou parallèle |
| Testicules | Parallèle |
| Utérus | Parallèle |
| Vessie | Parallèle |

Tableau 2 : Caractérisation architecturale des organes de la cavité pelvienne³

Un organe est composé de plusieurs types tissulaires, chaque tissu pouvant répondre à l'irradiation de façon précoce ou tardive. La tolérance globale prend en compte la tolérance de chaque tissu. Le rectum, par exemple, est composé d'une muqueuse, qui se renouvelle rapidement et réagit donc de manière précoce aux rayonnements, induisant l'apparition d'une rectite aiguë (inflammation du rectum). Le rectum possède également un tissu conjonctif de soutien, dont le renouvellement est lent. Les effets de l'irradiation sur ce tissu sont donc plus tardifs et mènent au développement d'une fibrose ou d'une sténose à long terme.

Plusieurs outils permettent de déterminer les doses de tolérance des OAR de manière spécifique à chaque organe :

- **HDV (Histogramme Dose/Volume)** : Outil permettant de visualiser la distribution de la dose dans les OAR inhomogène. Cet outil est systématiquement appliqué lors de l'établissement du plan de traitement. La dose de tolérance dépend ici de l'architecture fonctionnelle de l'organe (en série ou en parallèle, tableau 3).
 - Organe en série : Une dose élevée sur un petit volume est très toxique, la dose de tolérance constitue donc la dose maximale à ne pas dépasser.
Ex : Dose maximale de X Gy = La dose délivrée à l'OAR doit être impérativement inférieure ou égale à X Gy
 - Organe en parallèle : La dose de tolérance dépend de la distribution de la dose au sein de l'organe.
Ex : $V_x \leq Y\%$ signifie que la dose de X Gy ne doit pas être délivrée à plus de Y% du volume de l'OAR.

| Organe à risque | Dose de tolérance (HDV) |
|------------------------|--|
| Intestin grêle | Dose maximale de 50 Gy Dose maximale de 40 Gy sur un grand volume |
| Vessie | V60 ≤ 50% V70 ≤ 25% |
| Rectum (paroi rectale) | V60 ≤ 50 % V70 ≤ 25 % V74 ≤ 5 % |

Tableau 3 : Doses de tolérance des principaux organes à risque et des tissus sains en radiothérapie normofractionnée⁴

- **NTCP (Normal Tissue Complication Probability)** : Outil d'estimation des complications tardives lors d'une irradiation non homogène en prenant en compte la structure de l'organe, la dose reçue et le volume irradié. Cet algorithme exprime les résultats en pourcentage de risque qu'une complication sévère survienne à 5 ans (tableau 4). Il est facultatif et peut être utilisé en complément de l'HDV. Les doses sont exprimées en doses totales pour un traitement normofractionné et pour un volume défini.

| Organe | TD5/5 | | | TD50/5 | | |
|--------|-------|-----|----|--------|-----|----|
| | 1/3 | 2/3 | 1 | 1/3 | 2/3 | 1 |
| Côlon | 55 | - | 45 | 65 | - | 55 |
| Vessie | - | 80 | 65 | - | 85 | 80 |
| Rectum | - | - | 60 | - | - | 80 |

Tableau 4 : Doses (Gy) totales correspondant à un risque de complications de 5 % (TD5/5) et 50 % (TD50/5) à 5 ans selon le volume irradié (1/3, 2/3 ou 1 (totalité de l'organe))⁵

Malgré les nombreux outils et techniques existants, il subsiste néanmoins des facteurs induisant une plus forte radiosensibilité des OAR. Certaines pathologies, comme le diabète, peuvent augmenter la radiosensibilité du patient. L'âge du patient est également un paramètre important, notamment chez les enfants et les personnes âgées. Une susceptibilité individuelle peut intervenir, induisant une toxicité inattendue chez le patient. Enfin, les thérapies associées à la radiothérapie (chimiothérapie, thérapie ciblée...) peuvent induire une modification significative des doses de tolérance des OAR. L'apparition d'effets secondaires, aigus ou tardifs, dus à l'irradiation de tissu sain colorectal est donc généralement observée chez les patients traités par radiothérapie.

III. La Pelvic Radiation Disease

A. Atteinte de tissu sain colorectal

La zone colorectale située dans la région pelvienne comprend le côlon sigmoïde (partie basse du côlon) et le rectum (ampoule rectale et canal anal). Ces organes sont fixes, leurs mouvements sont restreints dans la cavité pelvienne, de par leur emplacement entre les os du pelvis (figure 8). De ce fait, il est parfois difficile d'éviter leur atteinte par les rayons lors d'une radiothérapie pelvienne. La capacité de renouvellement rapide de leur épithélium les rend extrêmement sensibles à l'irradiation, ils sont donc des organes à risques.

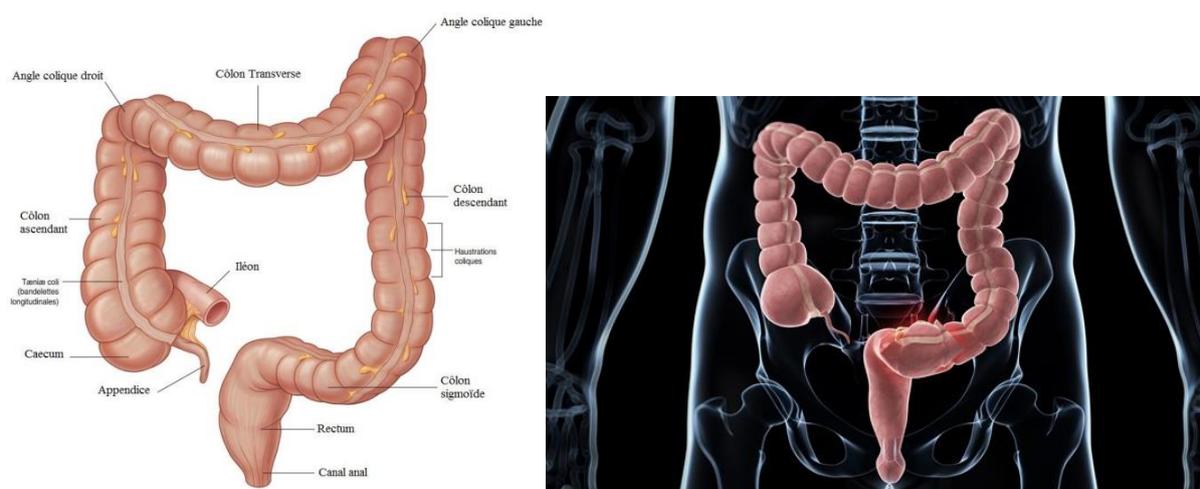


Figure 8 : Anatomie de la zone colorectale et position dans la cavité pelvienne

1. Fonctions et anatomie de la zone colorectale (tissulaire et cellulaire)

Le côlon et le rectum forment le gros intestin, organe de plus d'un mètre de long. Il remplit diverses fonctions pour l'organisme en participant au processus de digestion.

Le côlon récupère les résidus alimentaires n'ayant pas été digérés par l'intestin grêle. Ces résidus, sous forme liquide, vont alors subir un traitement durant leur passage dans le côlon. Grâce au péristaltisme, enchaînement de contractions et de relâchements du côlon, la circulation des aliments est facilitée. Le côlon absorbe l'eau résiduelle, permettant la formation de selles semi-solides. Les substances indigestes, telles que les fibres, sont décomposées par les bactéries, qui permettent la formation de nouveaux éléments nutritifs essentiels, comme certaines vitamines.

Le rectum reçoit les résidus en fin de parcours, sous la forme de selles, qui vont y être emmagasinées jusqu'à leur évacuation par l'anus.

Le côlon et le rectum sont composés de quatre compartiments structurels différents superposés (figure 9) :

- La muqueuse
- La sous-muqueuse
- La musculéuse
- La séreuse

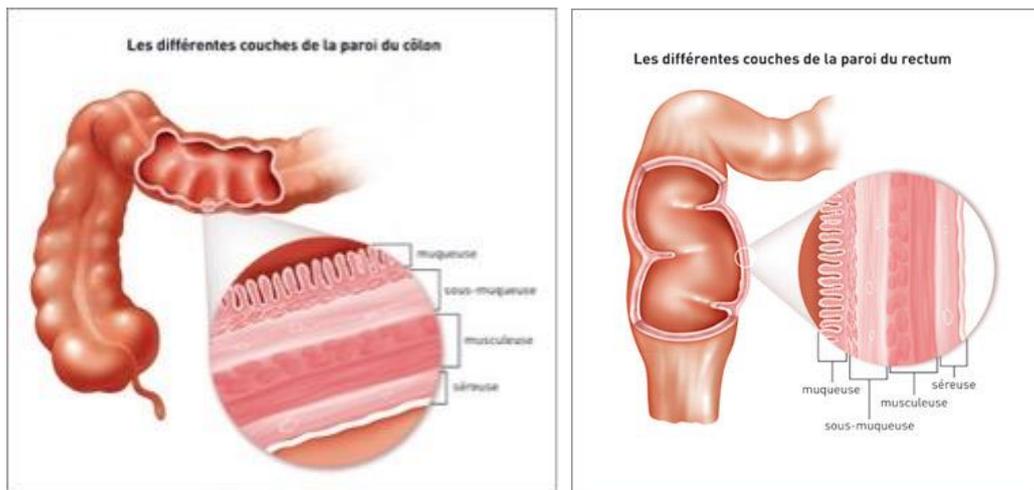


Figure 9 : Caractérisation des couches composant les parois colique et rectale

Ces membranes possèdent chacune une composition cellulaire distincte, avec des fonctions qui leur sont propres.

a. La muqueuse

La muqueuse colique et rectale est composée de cryptes, également nommées glandes de Lieberkühn, qui forment l'épithélium. La surface externe de l'épithélium est la partie de l'organe en contact avec l'extérieur, que l'on appelle plus communément la lumière colique. A l'inverse de l'intestin grêle, le côlon et le rectum ne possèdent pas de villosités, la muqueuse a donc un aspect lisse. Le chorion (ou lamina propria), tissu conjonctif sous-jacent de l'épithélium, permet le maintien de l'épithélium. Enfin, la musculaire-muqueuse, également appelée muscularis mucosa, permet d'établir une limite entre l'épithélium et la sous-muqueuse. Elle est constituée d'une mince couche de cellules musculaires lisses.

La muqueuse constitue une barrière physique face aux éléments extérieurs grâce à différents éléments. Les jonctions serrées et les jonctions d'ancrages, complexes protéiques spécifiques, permettent une adhérence entre les cellules et ainsi, bloquent le passage d'éléments

provenant de la lumière intestinale entre les cellules. Les jonctions communicantes, sous la forme de canaux tubulaires reliant les cellules, aident au passage d'ions et de petites molécules entre les cellules adjacentes. Le mucus possède également un rôle de filtre, en limitant la pénétration de molécules et de micro-organismes dans le tissu, et joue un rôle dans la protection de la muqueuse contre l'invasion de bactéries pathogènes.

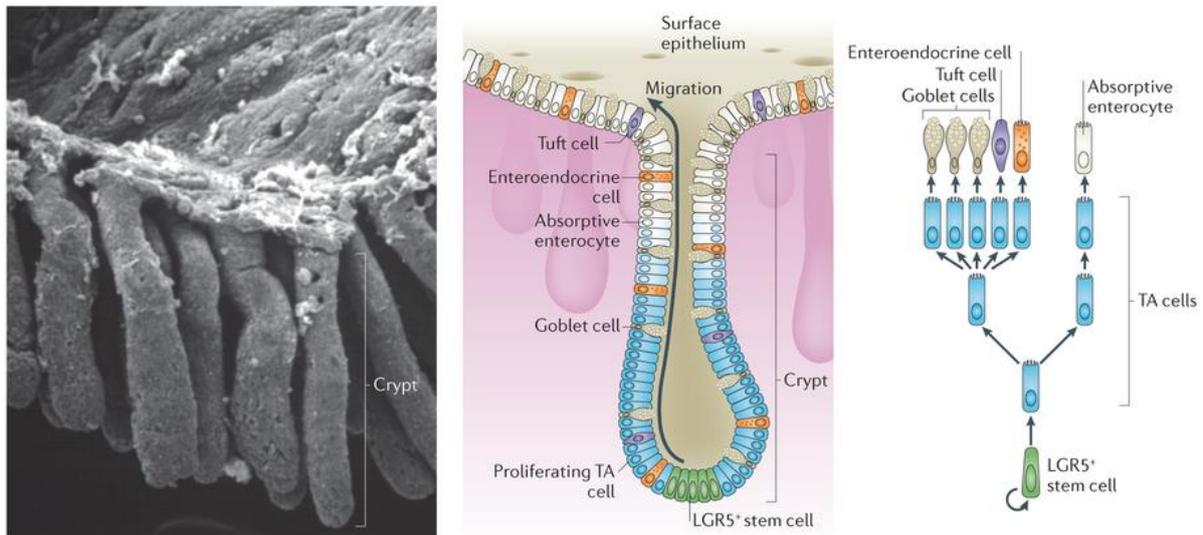


Figure 10 : Schématisation des types cellulaires présents dans la crypte colique⁶

L'épithélium est composé de nombreux types cellulaires qui permettent au côlon et au rectum d'assurer leurs fonctions (figure 10) :

- **Cellules souches et progénitrices** : Ces cellules permettent le renouvellement continu de l'épithélium. Le temps de remplacement cellulaire complet des cellules épithéliales est de 4 à 5 jours chez l'Homme. Ainsi, environ dix milliards de nouvelles cellules voient le jour quotidiennement. Les cellules souches, situées à la base de la crypte, vont subir une division asymétrique. Cette division aide à maintenir le stock de cellules souches de la crypte et à générer une population cellulaire transitoire, qui possède une forte activité proliférative, les cellules progénitrices. Les cellules progénitrices se différencient durant leur migration vers le haut de la crypte et se transforment progressivement en cellules différenciées (colonocytes, cellules à mucus, cellules entéroendocrines ou tuft cells). Une fois différenciées, les cellules ne prolifèrent plus, elles continuent leur migration vers la surface du côlon puis sont exfoliées dans la lumière colique par un processus nommé anoïkis.

- **Colonocytes** : Ces cellules sont des entérocytes du côlon, plus communément appelés cellules épithéliales ou encore cellules absorbantes, ce type cellulaire différencié est le plus abondant de l'épithélium. Les colonocytes permettent l'assimilation de l'eau, d'électrolytes et de nutriments.
- **Cellules à mucus** : Egalement connues sous le nom de cellules caliciformes ou de cellules en gobelet, elles renferment des granules intra-cytoplasmiques contenant des mucines. Ces mucines vont être sécrétées vers la lumière intestinale pour former le mucus qui recouvre l'épithélium. L'une des fonctions du mucus est de faciliter le passage des fèces dans le côlon et le rectum. Les cellules à mucus sont plus abondantes au fur et à mesure de la progression dans le tractus colorectal.
- **Cellules entéroendocrines** : En libérant des hormones, les cellules entéroendocrines vont agir sur l'épithélium afin de réguler la motricité et les sécrétions digestives. Elles régulent également la prolifération cellulaire et l'angiogenèse.
- **Tuft cells** : Bien qu'elles aient été découvertes il y a 60 ans, ce type de cellules est encore peu connu de nos jours. Ce n'est que récemment que des études ont été faites sur les fonctions des tuft cells (ou cellules en brosse). Grâce à ses microvillosités apicales dirigées vers la lumière intestinale, les tuft cells sont capables de détecter des éléments de l'environnement intestinal, lui conférant un rôle de chémorécepteur⁷. C'est lors d'études en condition d'infection par des parasites (Helminth et protozoaire) qu'une connexion entre les tuft cells et les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) a été découverte⁸ (figure 11). Afin d'éliminer le parasite, les tuft cells vont sécréter de l'IL-25. En réponse à cette sécrétion, les ILC2 vont à leur tour sécréter de l'IL-13, qui va agir sur les cellules souches et induire l'expansion des tuft cells et des cellules à mucus. En condition homéostatique, les tuft cells sont rares. Une augmentation de leur nombre a néanmoins été observée durant une inflammation colique, initiant un processus de réparation⁹. Certaines études suggèrent que les tuft cells font partie de la niche des cellules souches intestinales, puisque leur absence induit une régénération défectueuse des lésions épithéliales¹⁰. Enfin, ce type cellulaire peut sécréter de l'acétylcholine et de la prostaglandine de type 2, deux molécules pouvant activer la prolifération des progéniteurs⁹.

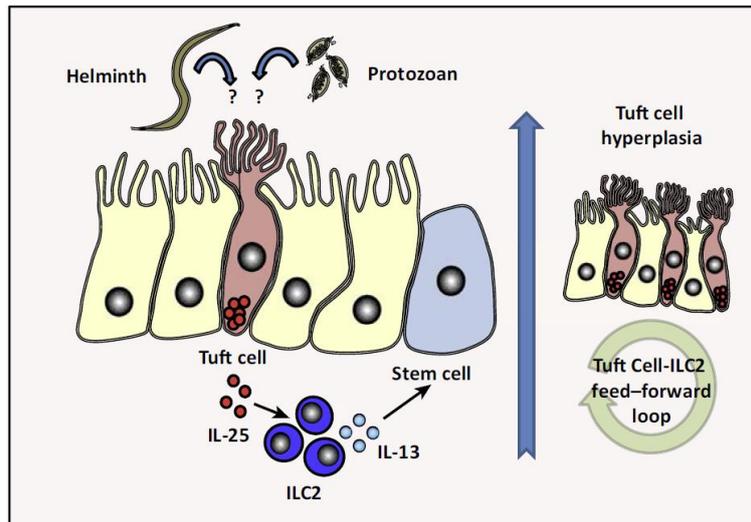


Figure 11 : Fonctions des tuft cells dans la réponse aux parasites Helminth et aux protozoaires¹¹

b. La sous-muqueuse

La sous-muqueuse relie la muqueuse à la couche musculuse. Elle est formée de tissu conjonctif lâche, sous la forme d'un plexus nerveux de Meissner et contient des vaisseaux (sanguins et lymphatiques) et des nerfs. Le rôle de ce plexus, relié au système nerveux parasympathique, est de permettre le bon fonctionnement des muscles et ainsi d'assurer le péristaltisme et les fonctions sécrétoires.

c. La musculuse

La musculuse est constituée de deux couches épaisses de cellules musculaires. L'orientation des cellules musculaires lisses est différente pour les deux couches. La couche interne est circulaire et la couche externe est longitudinale. Le plexus nerveux myentérique d'Auerbach et des cellules de Cajal (cellules « pacemaker »), situés entre les deux couches musculaires, contrôlent le rythme du péristaltisme.

d. La séreuse

La tunique externe, la séreuse, est composée de tissu conjonctif tapissée par un épithélium simple, également appelé mésothélium et est riche en adipocytes.

2. Caractérisation de l'atteinte colorectale radio-induite

Lorsque le côlon et le rectum sont exposés aux rayonnements ionisants, plusieurs phénomènes peuvent être observés et plusieurs paramètres vont être impliqués. Il s'agit donc d'une atteinte multifactorielle complexe.

a. Atteintes cellulaires et tissulaires

La chronologie exacte des événements se passant au sein même du tissu colorectal après irradiation n'est pas encore totalement établie. En effet, il est difficile de connaître l'ordre précis de l'apparition des lésions cellulaires et moléculaires. Les dommages cellulaires vont être initiés par action directe ou indirecte de l'irradiation. Les effets directs sont liés à l'action des rayonnements ionisants sur les macromolécules cellulaires elles-mêmes (acides nucléiques, lipides, protéines), menant à des lésions à l'ADN, l'oxydation des lipides et le dysfonctionnement des enzymes. Ces dommages entraînent des problèmes fonctionnels et des désordres métaboliques importants (figure 12).

L'un des premiers phénomènes observés au niveau tissulaire après irradiation est la formation de radicaux libres ou ROS (Reactive Oxygen Species) suite à la radiolyse des molécules d'eau¹². Les enzymes NOS (Nitric Oxide Synthase) sont activées, ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration en oxyde nitrique, une molécule signal impliquée dans le stress oxydant. Les radicaux libres vont interagir avec les macromolécules cellulaires, y induire des dommages tandis que le stress oxydant se transmet de cellules en cellules par un mécanisme nommé « bystander effect » par la transmission de signaux biochimiques intercellulaires qui conduit à l'étendue de dommages cellulaires autour de la zone atteinte¹³.

Les dommages causés aux cellules vont conduire à l'apoptose, la nécrose ou encore à la catastrophe mitotique.

Les cellules progénitrices sont connues pour être très radiosensibles, ce qui peut sembler positif au premier abord, puisque cela empêche l'accumulation de changements génomiques délétères¹⁴. Cependant, cette perte en cellules progénitrices induit un arrêt du renouvellement épithélial, ne permettant pas une régénération des cellules épithéliales perdues, ce qui conduit à une rupture dans la barrière intestinale.

Les jonctions serrées, éléments majeurs dans le maintien de la barrière épithéliale, sont altérées sous l'action des rayonnements ionisants. La perméabilité intestinale en est donc

augmentée, les produits et micro-organismes présents dans la lumière s'introduisent dans le tissu. La translocation bactérienne, c'est-à-dire l'introduction de bactéries dans la muqueuse, va déclencher une forte réponse inflammatoire et participer à l'apparition d'une inflammation chronique.

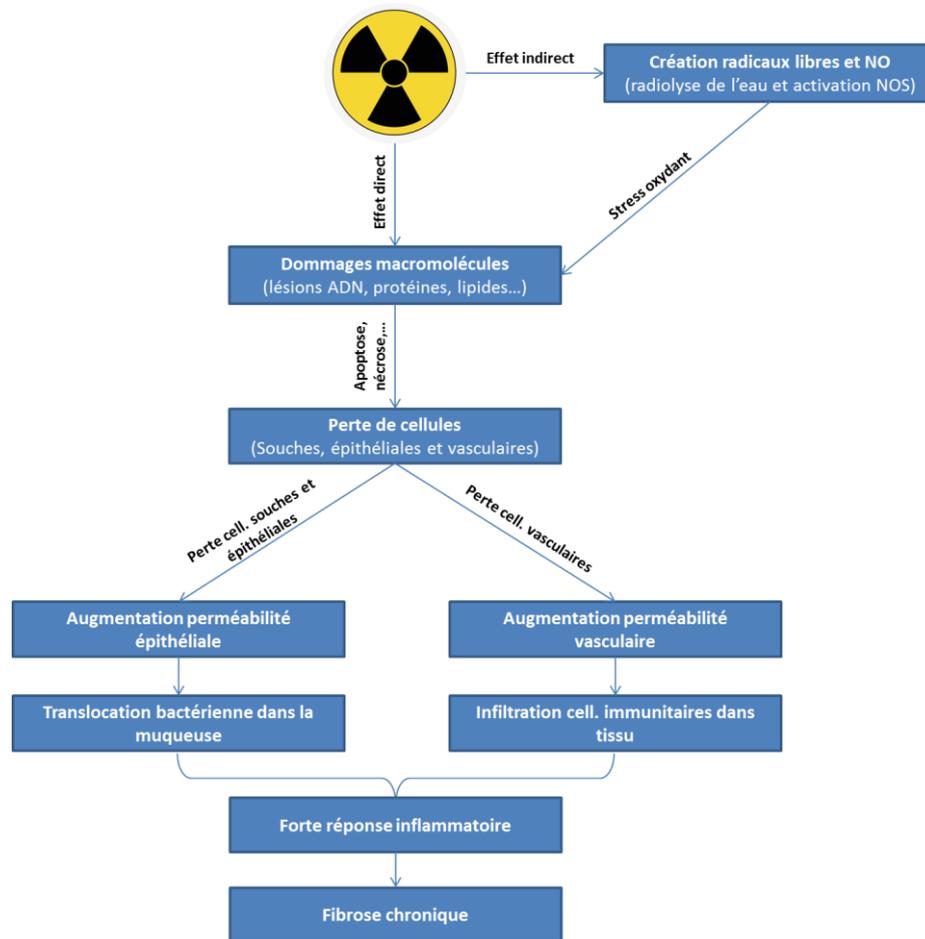


Figure 12 : Schématisation de la cascade des dommages radio-induits sur la muqueuse intestinale

Dans la cascade d'évènements participant à l'atteinte tissulaire radio-induite, d'autres types cellulaires que les cellules souches et épithéliales jouent également un rôle important, telles que les cellules endothéliales et les cellules musculaires¹⁵.

Après exposition aux rayonnements ionisants, l'endothélium (épithélium vasculaire) acquiert un phénotype pro-inflammatoire (recrutement de cellules inflammatoires), pro-thrombotique (formation de caillot sanguin) et anti-fibrinolytique (dissolution de caillot sanguin)¹⁶. La perte de cellules endothéliales induit une augmentation de la perméabilité vasculaire, induisant une infiltration importante de cellules immunitaires dans le tissu.

Enfin, les cellules musculaires lisses sont les principales responsables de l'apparition de fibrose dans l'intestin. La fibrose est une conséquence de l'irradiation pouvant survenir à long terme. C'est un processus lent qui se caractérise par l'accumulation de matrice extracellulaire, comme le collagène, pouvant mener à une perte de fonction musculaire de l'organe, notamment par l'épaississement de la paroi intestinale. Les cellules musculaires lisses acquièrent un phénotype pro-fibrotique après irradiation. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer ce changement : l'activation de certaines voies de signalisation (TGF β 1), mauvaise communication entre cellules endothéliales et cellules musculaires¹⁵.

b. Atteinte inflammatoire

En conditions normales, le processus inflammatoire est nécessaire à la cicatrisation de lésions. Cependant, dans le cadre d'une irradiation colorectale, l'inflammation peut devenir chronique et induire des dommages colorectaux à long terme.

Le premier signal inflammatoire induit après l'irradiation est la forte production de radicaux libres, puis les cellules immunitaires innées et adaptatives interviennent¹⁷. Plusieurs événements participent à l'infiltration excessive de cellules immunitaires dans le tissu. Premièrement, la modification de l'endothélium favorise le recrutement de leucocytes (neutrophiles, macrophages, lymphocytes). Deuxièmement, l'augmentation de la perméabilité épithéliale permet le passage de bactéries dans la muqueuse. Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires à migrer jusqu'à la lésion pour phagocyter et lyser les bactéries infiltrées. Cependant, après leur action antibactérienne, les neutrophiles se désintègrent et relarguent dans leur environnement de la myéloperoxidase (MPO), une enzyme qui participe au stress oxydant cellulaire.

Les macrophages interviennent également pour éliminer les bactéries infiltrées et les débris cellulaires après l'action des neutrophiles. Certains sont issus du recrutement leucocytaire, d'autres sont des macrophages résidents activés. En fonction de leur environnement, les monocytes ont la capacité de se différencier en différents types cellulaires. Une exposition à des cytokines pro-inflammatoires induirait une différenciation en macrophages pro-inflammatoires de type 1 (M1) tandis qu'une exposition à des cytokines anti-inflammatoires induirait des macrophages anti-inflammatoires de type 2 (M2). Cependant, l'implication des macrophages M1 et M2 dans le processus inflammatoire radio-induit est encore très discuté, dû au fait que les fonctions de chaque type macrophagique sont encore peu documentées¹⁸.

Après irradiation, la population de lymphocytes retrouvés dans le tissu colorectal augmente. Notamment les lymphocytes T CD4⁺, qui peuvent persister dans la muqueuse colorectale jusqu'à 2 mois après irradiation¹⁹. Les cellules T CD4⁺ ont la capacité de se différencier en sous-populations : Th1, Th2, Th17 et Treg (figure 13). Les types de cytokines retrouvées dans l'environnement ont une forte influence sur la différenciation et la maturation des lymphocytes T :

- **Les lymphocytes T helper de type 1 (Th1)** se différencient en présence d'IL-12. Ils sont associés à une réponse pro-inflammatoire et sécrètent de l'IFN γ .
- **Les lymphocytes T helper de type 2 (Th2)** se différencient en présence d'IL-4. Ils sont associés à une réponse pro-inflammatoire et sécrètent de l'IL-4, IL-5 et IL-13.
- **Les lymphocytes T helper de type 17 (Th17)** se différencient en présence d'IL-6 et de faibles doses de TGF β . Ils sont associés à une réponse pro-inflammatoire et sécrètent de l'IL-17 et IL-6.
- Enfin, **les lymphocytes T régulateur (Treg)** se différencient en présence de TGF β . Ils sont associés à une réponse anti-inflammatoire et sécrètent du TGF β . Ils ont un rôle de maintenance de la tolérance immunitaire de l'intestin en promouvant la production de cytokines anti-inflammatoires et en régulant les lymphocytes Th.

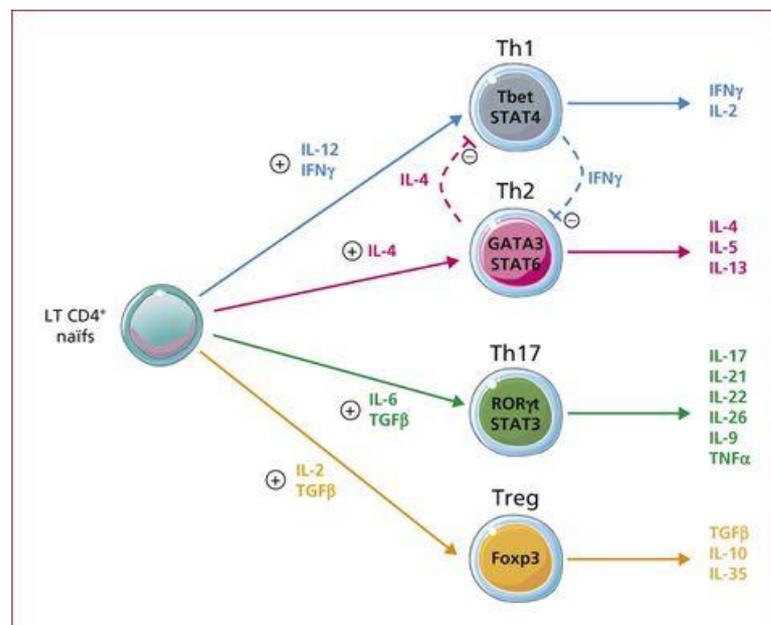


Figure 13 : Différenciation des lymphocytes T et cytokines associées²⁰

Ces quatre sous-populations, en conditions normales, se régulent entre elles pour maintenir l'homéostasie intestinale. En conditions pathologiques, après irradiation colorectale

notamment, un déséquilibre s'installe entre les sous-populations. Les taux de lymphocytes Th1 et Th2 sont déséquilibrés, avec une hausse des lymphocytes Th2²¹. Une augmentation de la population de Th17 est également observée après irradiation colorectale²². Enfin, les Treg sont augmentés dans le tissu colique mais ne sont pas fonctionnels et ne peuvent donc pas réguler les autres sous-populations²². En effet, ils ne sont plus capables d'induire la sécrétion d'IL-10.

Les mastocytes jouent également un rôle dans l'inflammation chronique après irradiation colorectale. Ces cellules jouent un rôle dans les réactions allergiques et d'hypersensibilité viscérale en excréant un très grand nombre de molécules (chymase, tryptase, histamine...). Chez les patients traités par radiothérapie pelvienne, on observe dans le tissu rectal une activation et une augmentation du nombre de mastocytes, qui vont produire une grande quantité de ces molécules. En réponse à ces molécules sécrétées par les mastocytes, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales vont se diriger vers un phénotype inflammatoire. L'irradiation colorectale de souris déficientes en mastocytes induit une diminution de l'apparition de lésions aiguës et chroniques, en comparaison à des souris contrôles irradiées²³. Les mastocytes ont également la capacité d'interagir avec l'environnement de la muqueuse, notamment avec le système nerveux entérique²⁴.

c. Inflammation et réparation tissulaire

L'inflammation est régulièrement décrite comme un processus néfaste pour la santé, cependant elle a également été décrite comme participant aux premières étapes de la réparation tissulaire. Les cellules de l'immunité innée (neutrophiles et macrophages) possèdent notamment un rôle clé dans les phases d'initiation de la régénération intestinale.

Les neutrophiles participent à la protection de l'organisme contre les infections grâce à leurs capacités antimicrobienne et phagocytaire. Après avoir phagocyté les bactéries introduites dans le tissu, les neutrophiles entrent en apoptose, ce qui déclenche des signaux qui atténuent le recrutement des neutrophiles²⁵. Les neutrophiles sécrètent également des radicaux libres aux propriétés microbicides afin de limiter l'invasion bactérienne dans le tissu²⁶. Cependant, lorsque cette production est excessive et durable dans le temps, les cellules et les tissus se retrouvent endommagés, les neutrophiles participent alors à la progression et à l'installation d'une inflammation chronique néfaste.

Les macrophages sont impliqués dans le développement et la régulation de l'inflammation ainsi que dans la réparation tissulaire²⁷. Ils nettoient le tissu en phagocytant les neutrophiles apoptotiques, les débris cellulaires ainsi que les bactéries. La phagocytose des neutrophiles induit leur sécrétion de médiateurs impliqués dans la suppression de la réponse inflammatoire (diminution de la production de TNF α , augmentation de la production de TGF β et IL-10)²⁸. Les macrophages sécrètent également des vésicules extracellulaires contenant des ligands WNT capables d'activer la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans les cellules épithéliales²⁹. Cette activation participe à la régénération intestinale en réponse à l'irradiation en favorisant la prolifération et le renouvellement des cellules souches.

Les cellules épithéliales sont également capables de sécréter des cytokines participant au maintien de l'homéostasie intestinales. Les cellules épithéliales intestinales, par l'activation de l'inflammasome, sont capables de sécréter de l'IL-18 et de l'IL-1 β . Un inflammasome est un complexe protéique dont l'assemblage dans la cellule est activé par des signaux de dangers (stress, bactéries...). L'inflammasome régule les processus d'activation de l'enzyme caspase-1, capable de transformer les précurseurs pro-IL1 β et pro-IL18 inactifs en cytokines actives³⁰. Dans le cas d'une inflammation aiguë, l'IL-18 stimule la réparation du tissu par le maintien de l'intégrité de la barrière, en induisant la prolifération des cellules épithéliales³¹, et de la fonction intestinale, par la préservation des cellules à mucus³². L'activation de l'inflammasome dans les cellules épithéliales est donc importante pour maintenir une barrière épithéliale et protéger la muqueuse (figure 14). Cependant, dans le cas d'une inflammation chronique, la sur-activation de l'inflammasome dans les cellules immunitaires devient délétère pour l'épithélium, en aggravant l'inflammation et en favorisant la tumorigenèse³³.

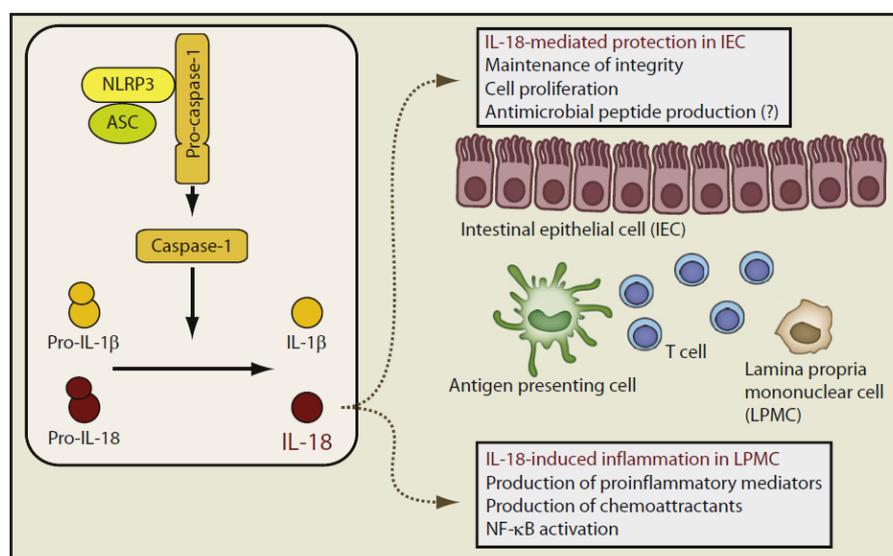


Figure 14 : Ambivalence de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation intestinale et l'intégrité de la barrière épithéliale³⁴

Les tuft cells, cellules épithéliales intestinales spécifiques, produisent de l'IL-25, cytokine considérée anti-inflammatoire pouvant induire une activation de l'immunité de type 2 et limiter la réponse immunitaire de type 1³⁵. Les cellules immunitaires de type 2 (ILC2 et Th2), en réponse au stimulus de l'IL-25, produisent de l'IL-4 et de l'IL-13. L'IL-13 induit la différenciation des cellules souches en cellules à mucus et en tuft cells, participant au maintien de ces populations dans la muqueuse colique. Ces deux cytokines sont également associées à la polarisation des macrophages de type 2^{36,37}, souvent représentés comme des acteurs de la réparation tissulaire³⁸.

La cytokine IL-7, sécrétée par les cellules à mucus³⁹, joue un rôle important dans le recrutement et l'activation des macrophages afin de protéger le tissu, et aide au développement et au maintien de l'homéostasie des lymphocytes T⁴⁰. L'IL-7 stimule également la sécrétion de l'IL-17 par les lymphocytes Th17 lors des premières étapes de lutte contre l'invasion de pathogènes⁴⁰.

Les cellules de l'immunité adaptative agissent également en faveur de la réparation tissulaire durant la phase aiguë de l'inflammation, notamment les lymphocytes Th17, connus pour produire la cytokine IL-17⁴¹. L'IL-17 est souvent associée à une inflammation nocive pour la santé, cependant, elle participe également à la prolifération épithéliale et au maintien de la barrière intestinale. En effet, sa présence stimule la formation de jonctions serrées (Claudin-1 et 2)⁴². L'IL-17 est aussi impliquée dans la réparation tissulaire, en s'associant au facteur FGF2 sécrété par les lymphocytes Treg⁴³.

Les acteurs de l'immunité innée et adaptative (cellulaires et moléculaires) sont souvent corrélés à une inflammation négative et jugés comme principaux responsables de l'apparition de pathologies inflammatoires dans les publications scientifiques. Certes, leur présence en excès et durant une période trop étendue entraînent des effets nocifs sur le corps, néanmoins leur présence en quantité contrôlée et sur une durée limitée est parfois nécessaire pour maintenir l'homéostasie et pour réparer le tissu en cas de lésions. Concernant les cytokines, les termes traditionnels pro et anti-inflammatoires semblent désuets et simplistes pour décrire leurs rôles dans le maintien de la santé et le développement de pathologie dans l'intestin. En effet, l'ambivalence de leurs effets, positifs ou négatifs, dépend fortement du temps d'analyse (inflammation aiguë ou chronique), de la concentration en cytokines (présence en excès ou en défaut), du modèle expérimental utilisé etc...

L'inflammation, bien que bénéfique aux premiers temps de l'irradiation pour la réparation du tissu lésé, induit des effets délétères lorsqu'elle perdure à long terme. Le patient est suivi par son oncologue radiothérapeute pendant toute la durée de son traitement par radiothérapie, ainsi que plusieurs années après (jusqu'à 5 ans), permettant de détecter et de soigner les effets secondaires de la thérapie pouvant survenir. En effet, les multiples atteintes colorectales radio-induites, tissulaires et inflammatoires, conduisent généralement à l'apparition de symptômes chez les patients traités par radiothérapie pelvienne, qui peuvent fortement atténuer leur qualité de vie et nécessiter une prise en charge médicale.

B. Symptômes liés à l'irradiation colorectale

Les effets secondaires observés chez les patients traités par radiothérapie pelvienne peuvent être dus à un risque accepté et pris en compte dans la stratégie thérapeutique choisie, mais ils peuvent également être dus à un effet inattendu ou imprévisible, comme une hypersensibilité inhabituelle du patient.

Le CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) est une classification de la sévérité des effets secondaires pouvant survenir au cours des traitements, notamment des procédures pour traiter le cancer⁴⁴. Cette classification se base sur la sévérité des conséquences des effets secondaires (figure 15). La première version a été mise en place par le NCI (National Cancer Institute) en 1984 et a évolué au fil du temps.

La dernière version a été publiée en 2017, cinq différents grades d'effet secondaire sont caractérisés :

- **Grade 1** (léger) : n'affecte pas l'activité quotidienne habituelle du patient. Signes ou symptômes ne nécessitant le plus souvent aucun traitement.
- **Grade 2** (modéré) : perturbe l'activité quotidienne habituelle du patient. Nécessite le plus souvent un traitement médical ambulatoire sans interruption du traitement par irradiation.
- **Grade 3** (sévère) : empêche l'activité quotidienne habituelle du patient. Nécessite un traitement avec hospitalisation et/ou un arrêt du traitement supérieur ou égal à 4 jours.
- **Grade 4** (très sévère) : menace le pronostic vital. Impose des mesures de réanimation.
- **Grade 5** (décès) : complication mortelle.

| Gastrointestinal disorders | | | | | |
|--|---|--|--|--|---------|
| CTCAE Term | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 | Grade 4 | Grade 5 |
| Abdominal pain | Mild pain | Moderate pain; limiting instrumental ADL | Severe pain; limiting self care ADL | - | - |
| Definition: A disorder characterized by a sensation of marked discomfort in the abdominal region. | | | | | |
| Bloating | No change in bowel function or oral intake | Symptomatic, decreased oral intake; change in bowel function | - | - | - |
| Definition: A disorder characterized by subject-reported feeling of uncomfortable fullness of the abdomen. | | | | | |
| Colitis | Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated | Abdominal pain; mucus or blood in stool | Severe abdominal pain; peritoneal signs | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by inflammation of the colon. | | | | | |
| Colonic fistula | Asymptomatic | Symptomatic, invasive intervention not indicated | Invasive intervention indicated | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by an abnormal communication between the large intestine and another organ or anatomic site. | | | | | |
| Colonic hemorrhage | Mild symptoms; intervention not indicated | Moderate symptoms; intervention indicated | Transfusion indicated; invasive intervention indicated; hospitalization | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by bleeding from the colon. | | | | | |
| Colonic obstruction | Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated | Symptomatic; altered GI function | Hospitalization indicated; invasive intervention indicated | Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by blockage of the normal flow of the intestinal contents in the colon. | | | | | |
| Colonic perforation | - | Invasive intervention not indicated | Invasive intervention indicated | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by a rupture in the colonic wall. | | | | | |
| Colonic stenosis | Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated | Symptomatic; altered GI function | Severely altered GI function; tube feeding or hospitalization indicated; elective operative intervention indicated | Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by a narrowing of the lumen of the colon. | | | | | |
| Constipation | Occasional or intermittent symptoms; occasional use of stool softeners, laxatives, dietary modification, or enema | Persistent symptoms with regular use of laxatives or enemas; limiting instrumental ADL | Obstipation with manual evacuation indicated; limiting self care ADL | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by irregular and infrequent or difficult evacuation of the bowels. | | | | | |
| Gastrointestinal disorders | | | | | |
| CTCAE Term | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 | Grade 4 | Grade 5 |
| Diarrhea | Increase of <4 stools per day over baseline; mild increase in ostomy output compared to baseline | Increase of 4 - 6 stools per day over baseline; moderate increase in ostomy output compared to baseline; limiting instrumental ADL | Increase of >=7 stools per day over baseline; hospitalization indicated; severe increase in ostomy output compared to baseline; limiting self care ADL | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by an increase in frequency and/or loose or watery bowel movements. | | | | | |
| Fecal incontinence | Occasional use of pads required | Daily use of pads required | Severe symptoms; elective operative intervention indicated | - | - |
| Definition: A disorder characterized by inability to control the escape of stool from the rectum. | | | | | |
| Flatulence | Mild symptoms; intervention not indicated | Moderate; persistent; psychosocial sequelae | - | - | - |
| Definition: A disorder characterized by a discharge of excessive gas from the lower GI tract. | | | | | |
| Proctitis | Rectal discomfort, intervention not indicated | Symptomatic (e.g., rectal discomfort, passing blood or mucus); medical intervention indicated; limiting instrumental ADL | Severe symptoms; fecal urgency or stool incontinence; limiting self care ADL | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by inflammation of the rectum. | | | | | |
| Rectal fistula | Asymptomatic | Symptomatic, invasive intervention not indicated | Invasive intervention indicated | Life-threatening consequences; urgent intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by an abnormal communication between the rectum and another organ or anatomic site. | | | | | |
| Rectal stenosis | Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated | Symptomatic; altered GI function | Severely altered GI function; tube feeding or hospitalization indicated; elective operative intervention indicated | Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated | Death |
| Definition: A disorder characterized by a narrowing of the lumen of the rectum. | | | | | |

Figure 15 : Caractérisation et terminologie des troubles gastro-intestinaux associés à des effets secondaires par le CTCAE⁴⁴

Une grande majorité des patients présentent des effets secondaires aigus mais temporaires, tandis qu'une minorité développe des symptômes chroniques et à long terme. Après leur radiothérapie pelvienne, 50% des patients estiment que leur qualité de vie est altérée par les symptômes gastro-intestinaux radio-induits, dont 20 à 40% jugent cette altération comme modérée ou sévère⁴⁵.

1. Symptômes aigus

Environ 90% des patients traités par radiothérapie pelvienne vont développer des symptômes aigus durant leur traitement et observent un changement permanent dans leur transit intestinal⁴⁶. Les effets secondaires apparaissent jusqu'à 3 mois après le début du traitement et disparaissent progressivement, en général de un à 3 mois après la fin de la radiothérapie. Ces effets sont dus à la réaction des muqueuses colique et rectale, liée à la perte importante des cellules à renouvellement rapide dont sont composées les muqueuses. Les réactions sont précoces et se développent en cours de traitement, notamment à cause du cumul de séances de radiothérapie. Les effets secondaires (douleurs abdominales, ballonnements, diarrhées, fatigue...) sont pénibles pour le patient et peuvent être responsables de l'interruption temporaire du traitement, par exemple dans le cas de l'apparition de diarrhées sévères lors d'un traitement par radiothérapie du rectum.

2. Symptômes chroniques et PRD

Lorsque les symptômes perdurent ou apparaissent à partir de 3 mois après la fin des séances de radiothérapie, ils sont considérés comme tardifs⁴⁶. Cependant, ils peuvent également apparaître plusieurs années après la fin du traitement. Chez 5 à 10% des patients, les symptômes chroniques se révèlent jusqu'à 10 ans après la radiothérapie et jusqu'à 20 ans pour 20% des patients⁴⁷. Les effets secondaires tardifs sont le résultat d'une perte de la fonctionnalité du côlon et/ou du rectum. Les cellules souches et progénitrices sont détruites et les cellules fonctionnelles ne sont pas renouvelées. De plus, les atteintes du tissu de soutien conduisent à l'apparition de fibrose. Ces multiples atteintes induisent la perte de la fonction des organes et de lourds symptômes s'installent, tels que l'altération du transit intestinal (constipation, diarrhée), une incontinence, des hémorragies et une douleur chronique. Dans les cas les plus graves, les patients peuvent également présenter une obstruction colique, une nécrose en cas d'ischémie, ou encore des fistules.

En 30 ans, le nombre de survivants à long terme du cancer a triplé⁴⁷ augmentant de fait le nombre de patients traités par radiothérapie pelvienne pouvant être atteints par des symptômes chroniques liés à la toxicité intestinale radio-induite sur les tissus sains. Ces symptômes affectent fortement la qualité de vie des patients, néanmoins, très peu d'attention leur est portée de la part des industries pharmaceutiques, des cliniciens et des chercheurs. En 2010, H.J.N. Andreyev et al. ont défini une nouvelle pathologie, la Pelvic Radiation Disease (ou PRD), pour aider à la prise en charge des patients présentant des symptômes à la suite d'une irradiation pelvienne⁴⁵. La définition de la PRD est la suivante : « Problèmes transitoires ou à long terme, classés de modérés à très sévères, se développant sur des tissus non-cancéreux à la suite d'un traitement par radiothérapie pour une tumeur d'origine pelvienne ». Cette définition peut s'appliquer pour des symptômes colorectaux, mais également pour des symptômes urinaires, liés aux organes reproducteurs, aux os ainsi qu'à la peau. Pour ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés aux atteintes colorectales après radiothérapie pelvienne.

L'absence de précision sur les symptômes colorectaux observés après irradiation pelvienne et leur mauvaise compréhension a conduit à un manque de prise en compte de cette maladie par les professionnels de santé. Les traitements existants pour remédier aux atteintes colorectales de la radiothérapie sont encore inefficaces, beaucoup traitent les symptômes, très peu cherchent à en traiter la cause.

IV. Traitements de l'atteinte colorectale radio-induite : Une thérapie actuelle inefficace

Les principaux symptômes ciblés par les traitements existants sont les hémorragies, la constipation, voire l'obstruction, la diarrhée et l'incontinence fécale. La grande majorité des traitements sont symptomatiques, ils ne s'attaquent généralement qu'à la conséquence de l'effet de secondaire et non pas à l'origine de l'effet secondaire lui-même. Les effets des traitements symptomatiques ne sont donc que temporaires et ne durent que l'instant du traitement, l'effet s'estompent progressivement. Quelques traitements curatifs existent, mais malheureusement ces traitements sont souvent inefficaces et/ou peuvent engendrer eux-mêmes de sévères complications chez les patients (Tableau 5).

L'hémorragie rectale, liée à la télangiectasie des vaisseaux de la muqueuse, peut être traitée par différentes techniques : la prise de sucralfate, le traitement en caisson d'oxygène

hyperbare ou par la thérapie thermique et enfin l'utilisation de formaline. Certaines de ces méthodes présentent cependant des risques pour le patient. L'utilisation du laser argon en thérapie thermique, par exemple, permet de coaguler les vaisseaux atteints par l'irradiation et a pour but de stopper les hémorragies. Cependant, cette technique peut entraîner de très graves complications chez les patients, en particulier ceux ayant reçu une transfusion sanguine⁴⁷. Des cas d'explosion, de rétrécissement, d'ulcération et de perforation intestinale, de fistules et de douleurs à long terme ont été observés⁴⁷.

La fibrose entraîne un rétrécissement colique pouvant évoluer en obstruction chez les patients les plus sévèrement atteints. Pour contrer son apparition et son évolution, la prescription d'anti-oxydants (comme la vitamine E) ou l'utilisation de l'oxygène hyperbare sont généralement indiqués. Néanmoins, l'efficacité de ces traitements peut être remise en cause par les risques encourus par le patient, notamment lors du traitement en oxygène hyperbare. En effet, cette méthode thérapeutique augmente les risques de dysfonctionnements pulmonaires, oculaires et auriculaires chez le patient, même si ces effets secondaires sont relativement rares⁴⁸.

La chirurgie est indiquée pour les cas les plus graves, comme les patients présentant des fistules, des nécroses ou des occlusions (grade IV/V). C'est le traitement utilisé en dernière intention, lorsque les autres traitements possibles se sont montrés inefficaces. Mais le risque de complications post-opératoires et le taux de morbidité sont très élevés, surtout chez les patients ayant reçu une radiothérapie, en comparaison avec ceux n'en ayant pas reçu^{47,49,50}.

Les troubles du transit, pouvant alterner entre diarrhée et constipation, sont liés à des atteintes multiples et sont donc traités par plusieurs approches thérapeutiques. Les spasmes musculaires, l'inflammation, la malabsorption des acides biliaires et des carbohydrates et la croissance bactérienne sont souvent à l'origine de ces désordres intestinaux. Plusieurs types de traitements peuvent être prescrits, comme les traitements chimiques (anti-inflammatoires, chélateurs d'acides biliaires) et les traitements microbiologiques (antibiotiques, probiotiques et prébiotiques)⁵¹. Des médecines complémentaires sont également proposées pour traiter ce type de symptôme. Les conseils diététiques permettent de limiter les aliments pouvant causer des diarrhées, des constipations et des flatulences⁵². Les exercices de renforcement musculaire (ou exercices de Kegel pour plancher pelvien) aident à contrôler les incontinences fécales et les exercices de posture facilitent l'évacuation

des selles, et aide donc à lutter contre la constipation, par l'adoption d'une posture spécifique⁵².

Plus récemment, un intérêt pour les médecines alternatives, dites non conventionnelles, est apparu. En effet, l'acupuncture, l'hypnothérapie et la méditation/sophrologie, peuvent aider à réguler le transit intestinal, à gérer la fatigue ainsi que les douleurs abdominales^{51,52}.

Les lésions colorectales induites par la radiothérapie pelvienne impliquent de nombreuses altérations structurales et immunitaires. Malgré un grand nombre de traitements actuels, aucun n'est suffisamment efficace pour traiter les causes de la PRD colorectale. Il est donc primordial de trouver de nouvelles pistes pour remédier à cette maladie, qui touche de plus en plus de patients chaque année. L'utilisation de modèles pré-cliniques a permis de découvrir les mécanismes sous-jacents de ces altérations et à rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de remplacer les traitements actuels inefficaces afin de traiter efficacement les causes des lésions colorectales radio-induites. Récemment, un nouvel élément jouant un rôle dans l'apparition de symptômes de la PRD a fait son apparition. En effet, en 2014 Andreyev publie une revue dans laquelle il explique la potentielle implication du microbiote intestinal dans la toxicité intestinale radio-induite⁵³. Cette hypothèse se base sur des résultats cliniques, démontrant une modification des populations microbiennes du microbiote intestinal chez les patients traités par radiothérapie pelvienne. De plus, parmi les traitements existants, certains agissent par une modulation de la population bactérienne intestinale (antibiotiques, conseils diététiques), appuyant l'importance du rôle du microbiote pour la prise en charge des lésions colorectales radio-induites. Un traitement permettant d'agir sur la modification du microbiote après irradiation ou d'empêcher son apparition, un probiotique par exemple, serait un candidat idéal pour contrer le développement des lésions colorectales radio-induites.

| Effet secondaire | Symptômes associés | Traitements | Mécanisme | Inconvénients |
|---------------------|--|---|---|---|
| Télangiectasie | Hémorragie | Sucralfate, métronidazole | Diminution production de prostaglandines (sucralfate) et antibiotique (métronidazole) | Métronidazole : Risque de neuropathie irréversible |
| | | Oxygène hyperbare | Néo-angiogenèse | Risque de dysfonctionnement pulmonaire, problèmes oculaires et auriculaires |
| | | Thérapie thermique laser argon, laser ND YAG | Coagulation locale et cicatrisation des vaisseaux | 19 à 35% de complications (rétrécissement, perforation, fistule...) |
| | | Formaline | Effet sclérosant sur les lésions hémorragiques | Risque de complications (sténose, ulcération...) |
| Fibrose | Obstruction intestinale, rétrécissement intestinal | Anti-oxydants pentoxifylline, vitamine E, superoxyde dismutase cuivre-zinc | Elimination des radicaux libres | Pentoxifylline : Eruption cutanée, risque d'hémorragie |
| | | Oxygène hyperbare | Néo-angiogenèse | Risque de dysfonctionnement pulmonaire, problèmes oculaires et auriculaires |
| Spasmes musculaires | Diarrhée, incontinence fécale | Exercices plancher pelvien | Renforcement musculaire du plancher pelvien | - |
| Inflammation | Diarrhée, incontinence fécale, fibrose | Anti-inflammatoires sulfasalazine, balsalazine, olsalazine, corticostéroïdes, orgotéine... | Diminution de l'inflammation locale | - |
| - | Perforation, fistule, adhésion tissulaire... | Chirurgie | Pour les cas les plus sévères : ablation de la zone atteinte | Forte morbidité, complications post-opératoires chez 30% des patients |

Tableau 5 : Traitements existants contre les effets secondaires colorectaux de la radiothérapie pelvienne^{47,50-52}

| Effet secondaire | Symptômes associés | Traitements | Mécanisme | Inconvénients |
|---------------------------------------|---|--|---|---|
| Malabsorption acide biliaire | Diarrhée, stéatorrhée, incontinence fécale | Chélateurs d'acide biliaire aluminium hydroxide, budesonide, colesevelam, colestipol et cholestyramine... | Liaison avec les acides biliaires pour faciliter leur élimination | Cholestyramine : Possibilité de promotion du cancer du côlon, sévères complications intestinales (hémorragies, douleurs...) |
| Croissance bactérienne | Diarrhée, obstruction intestinale | Antibiotiques ciprofloxacine, doxycycline, clarithromicine, métronidazole, rifaximine... | Régulation de la quantité bactérienne intestinale | Effet temporaire, risque d'infection par <i>Clostridium difficile</i> à long terme, résistance bactérienne... |
| | | Probiotiques et prébiotiques | | - |
| | | Conseils diététiques | | - |
| Malabsorption carbohydrates | Diarrhée, incontinence fécale | Conseils diététiques | Limiter l'absorption de sucres non absorbés (lactose, fructose, sucrose...) | - |
| Changement vitesse transit intestinal | Diarrhée, constipation, obstruction intestinale | Diminution vitesse transit lopéramide (opioïde) | Ralentissement du transit intestinal | Constipation, distension et douleur abdominale |
| | | Augmentation vitesse transit Exercices de posture | Facilite l'évacuation par un travail sur la posture aux toilettes | - |

Tableau 5 (suite)

CHAPITRE II

Le microbiote intestinal : Fonctions et dysbiose radio-induite

I. Le microbiote intestinal

A. Découverte du microbiote

Depuis l'antiquité, la maladie est associée à une agression du corps par un mal venant de l'extérieur. Pour éliminer ce mal, un organe en particulier est traité, celui permettant une communication entre l'extérieur et l'intérieur, l'intestin. Les traitements vomitifs et purgatifs étaient alors des pratiques thérapeutiques couramment utilisés dans plusieurs cultures à travers le monde et les âges. Des représentations graphiques et des écrits décrivent l'utilisation de ces traitements par les anciennes civilisations, telles que l'Égypte ancienne, l'Asie féodale, la civilisation Maya ou encore en Occident durant le Moyen-Âge et la Renaissance (figure 16).



Figure 16 : Représentations sculpturales et graphiques de l'utilisation du lavement rectal dans les cultures ancestrales

Le monde de l'invisible intrigue l'Homme depuis des millénaires, quels sont ces éléments vivants dans l'air, l'eau et les aliments et pouvant causer des maladies ? Durant l'antiquité, Hippocrate les nommait sous le terme de « miasmes », mais c'est à partir de 1683, grâce à l'invention du microscope par Antoni Van Leeuwenhoek, que les micro-organismes seront pour la première fois observés et étudiés. Van Leeuwenhoek les décrit alors comme des « animalcules » (figure 17). Durant les siècles qui suivirent, les micro-organismes seront classés en tant qu'animaux, puis en tant que végétaux, proches des algues. Ce n'est qu'à la fin du 19^e siècle que les bactéries seront classées sous un règne distinct.

P.J. Van Beneden (1809-1894), zoologiste belge, inventa les concepts de parasitisme et de commensalisme. Le terme « commensalisme », signifiant étymologiquement « compagnon de table », se distingue alors du « parasitisme » en 1860. Le commensalisme décrit l'association entre deux espèces avec ou sans partage de compétences, tandis que le parasitisme signifie que la vie d'un individu dépend de son hôte. En 1879, Anton de Bary initia le concept de « symbiose », notion regroupant les divers modes d'association sous le principe du « vivre ensemble ».

C.J. Davaine (1812-1882) définit les microbes en tant qu'ensemble de « ferments » et de « virus », mais qui ne sont pas des parasites car ils sont capables de se propager dans des milieux inorganiques. Elie Metchnikoff (1845-1916), grâce à ses études approfondies, établit une corrélation entre la symbiose et le « microbisme » intestinal.

L'intérêt scientifique des micro-organismes se précise grâce aux recherches de Louis Pasteur (1822-1895) et de son équipe. Ses études sur les transformations chimiques par les bactéries, comme la putréfaction et les fermentations, le mènent à la découverte de la fermentation lactique en 1857. Le rôle des micro-organismes dans la digestion se clarifie à la fin du 19^e siècle, l'importance de la « microflore » intestinale est alors établie. En 1885, T. Escherich, pionnier dans l'étude de la flore intestinale de l'enfant, découvre la *Bacterium coli communior*, qui porte aujourd'hui son nom : *Escherichia coli* (*E. coli*). Cette bactérie agit bénéfiquement sur la digestion de l'enfant puisqu'elle colonise l'intestin dès le plus jeune âge. À la suite de ce constat, H. Tissier découvre la présence quasiment exclusive des bifidobactéries dans l'intestin des enfants nourris au sein en comparaison avec des enfants nourris avec du lait artificiel. Les enfants nourris au sein développent moins de diarrhées que ceux nourris artificiellement. Cette découverte met en lumière l'impact de l'alimentation sur la composition de la flore intestinale et sur la santé humaine.

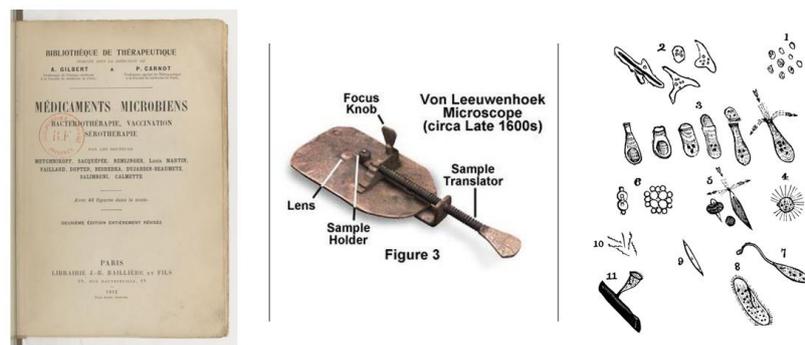


Figure 17 : « Médicaments microbiens » par E. Metchnikoff (gauche), Microscope de Van Leeuwenhoek (milieu), dessins des « animalcules » par Van Leeuwenhoek (droite)

Au début du 20^e siècle, E. Metchnikoff émet le concept de « bactériothérapie » afin d'équilibrer la flore intestinale. Dans son livre « Médicaments microbiens » publié en 1909, il décrit le principe de cette bactériothérapie : Le respect d'un régime alimentaire équilibré, notamment en consommant des aliments fermentés pour apporter des bactéries, auquel peut être ajouté un apport en bactéries issues de cultures artificielles. Il s'agit là des prémices de l'utilisation de probiotiques (figure 17).

B. Le microbiote intestinal humain

1. Définition du microbiote

Le corps humain compte environ 500 milliards de cellules et au moins autant de micro-organismes à la surface des organes en contact avec l'extérieur. L'ensemble de ces micro-organismes, tels que des bactéries, des virus, des champignons et des archées, hébergés par le corps, représente le microbiote humain. Plusieurs microbiotes existent : dans le tractus digestif (de la bouche à l'anus), le système respiratoire, l'appareil uro-génital et sur la peau, la plus grande communauté de micro-organismes résidant dans l'intestin. Ces microbiotes ont un rôle important dans le maintien de la santé et du bien-être de l'hôte.

2. Composition et répartition du microbiote intestinal humain

La constitution du microbiote intestinal commence dès la naissance. Le nouveau-né entre en contact avec le microbiote vaginal et fécal de la mère. Les entérobactéries et les bifidobactéries (d'origine fécale) et les lactobacilles (d'origine vaginale) sont les premières bactéries à coloniser l'intestin du nouveau-né, puis le microbiote se diversifie en fonction de son alimentation et de son environnement. Durant les premiers jours de vie, les premières bactéries colonisatrices de l'intestin sont aérobies strictes ou facultatives, elles consomment l'oxygène présent et participent à la mise en place d'un environnement favorable pour l'implantation de bactéries anaérobies strictes, comme celles des genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium*. Le microbiote va alors évoluer et se diversifier durant trois ans avant de se stabiliser et de se rapprocher du microbiote adulte.

Le règne des bactéries est divisé en différents taxons (phylum, classe, ordre...). L'arbre phylogénétique est un schéma de classification permettant de regrouper les bactéries par taxons, c'est-à-dire que ces bactéries sont apparentées et possèdent des caractéristiques taxonomiques et diagnostiques communes (figure 18). Cette classification est couramment

utilisée afin de caractériser les populations de micro-organismes, notamment lors d'analyse de microbiote.

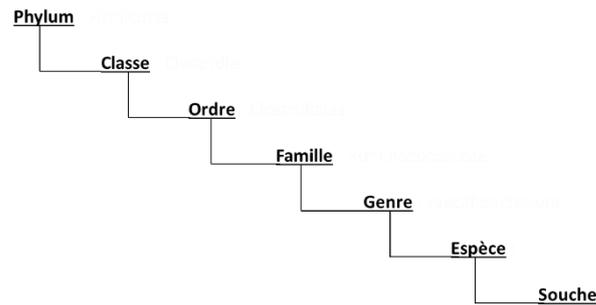


Figure 18 : Schéma de phylogénétique bactérienne

Environ mille espèces bactériennes peuvent être retrouvées dans le microbiote intestinal et un individu abrite 150 à 170 espèces dans son intestin. Chaque personne adulte possède son propre microbiote, il existe donc une notion d'inter-individualité. Cependant, un tronc commun de bactéries est retrouvé dans tous les microbiotes intestinaux. Cinq phyla bactériens dominent le microbiote : Les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria, les Proteobacteria et les Verrucomicrobia⁵⁴.

Les Firmicutes et les Bacteroidetes sont fortement représentées dans le microbiote humain. Dans le phylum des Firmicutes, le groupe *Clostridium leptum* représente 16 à 22% du microbiote total. Les espèces *F. prausnitzii*, *R. albus* et *R. flavefaciens* sont des bactéries commensales appartenant à ce groupe. Le phylum Bacteroidetes est composé en majeure partie par le genre Bacteroides. Les Actinobacteria, Proteobacteria et Verrucomicrobia sont plus faiblement représentées dans le microbiote. Parmi les Actinobacteria, on retrouve le genre Bifidobacteria. Les bactéries les plus communes du phylum Proteobacteria appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae, dont fait partie le genre Escherichia. Enfin, la bactérie la plus connue du phylum Verrucomicrobia, phylum très faiblement représenté (environ 0,1%) est *Akkermansia muciniphila*^{55,56}.

La majeure partie du microbiote intestinal est représentée par les bactéries, en effet environ 90% du microbiote est composé d'espèces bactériennes variées. Cependant, d'autres types de micro-organismes sont présents dans le microbiote intestinal :

- Les champignons représentent 2 à 3% des micro-organismes intestinaux, ils sont beaucoup moins nombreux que les bactéries mais sont cent fois plus volumineux que ces dernières, leur biomasse est donc conséquente dans le microbiote. Les données concernant le microbiote fongique sont encore très restreintes, peu d'études ont été

faites sur la diversité des espèces fongiques retrouvées dans l'intestin. A ce jour, on dénombre une dizaine d'espèces de champignons dans l'intestin, dont *Candida albicans*. Cette espèce est dite pathogène opportuniste, ce qui signifie qu'elle est inoffensive en condition normale, lorsque sa croissance est contrôlée, mais que si la possibilité de se développer se présente à elle, elle entraîne l'apparition de maladies.

- Les virus retrouvés dans le microbiote sont en grande majorité des virus bactériophages, c'est-à-dire qu'ils s'attaquent uniquement aux bactéries. Les virus s'attaquant aux cellules eucaryotes (et donc aux cellules humaines) sont quasiment absents ou en très faible quantité chez les individus sains. On estime qu'il y aurait dix fois plus de virus bactériophages que de bactéries elles-mêmes dans le microbiote intestinal. Les bactériophages participent au contrôle des populations bactériennes et au maintien d'un équilibre entre les différentes populations. Ils sont également capables de transmettre des informations génétiques entre les bactéries⁵⁷.
- Les archées, longtemps considérées comme des bactéries, ne sont ni eucaryotes, ni procaryotes, elles représentent le troisième domaine du vivant. Très peu de données sont disponibles à leur sujet. Cependant, un genre d'archée nommé *Methanobrevibacter*, retrouvé dans l'intestin, pourrait jouer un rôle important dans le microbiote. Ce genre d'archée consomme le dihydrogène et produit du méthane. Une étude a démontré que l'archée *Methanobrevibacter smithii* influence la spécificité et l'efficacité de la digestion de polysaccharides par les bactéries ainsi que l'adipogenèse de l'hôte⁵⁸.

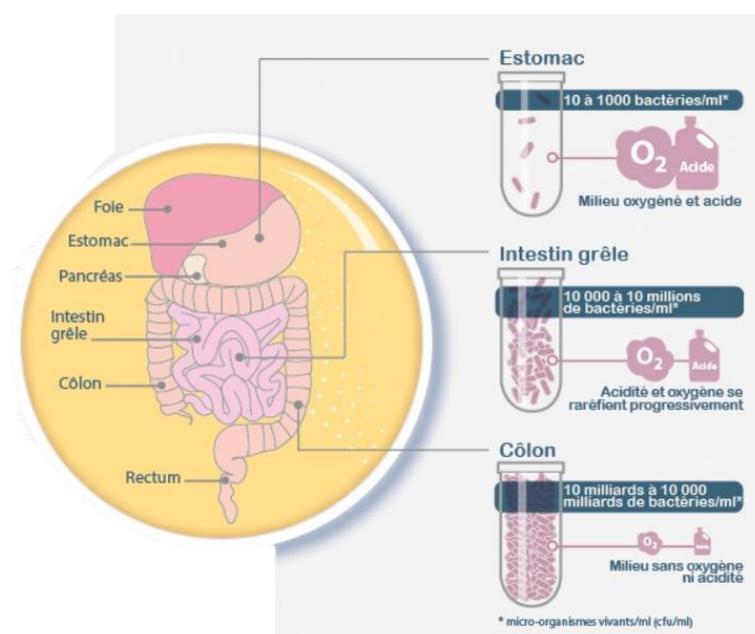


Figure 19 : Concentrations bactériennes dans les organes du tractus gastro-intestinal
(Source : inserm.fr/microbiote-intestinal)

Le microbiote intestinal possède jusqu'à 10^{14} bactéries, la concentration en bactéries variant le long du tractus digestif (figure 19). En effet, l'estomac contient jusqu'à 10^3 bactéries par mL, tandis que le côlon en contient entre 10^9 et 10^{11} unités par mL de contenu fécal, en faisant l'un des écosystèmes microbiens le plus densément peuplé en bactéries de la planète. L'environnement de chaque organe va définir quels types de bactéries vont se développer. Deux paramètres vont former cet environnement, la concentration en oxygène et l'acidité du milieu. L'estomac contient une forte concentration en oxygène et une importante acidité, ces paramètres vont diminuer au fur et à mesure de la progression dans le tractus digestif, jusqu'à atteindre un milieu sans oxygène et sans acidité dans le côlon. De ce fait, les espèces dominantes des microbiotes de chaque organe se diversifient : aérobies pour l'estomac et anaérobies strictes pour le côlon.

3. Fonctions du microbiote intestinal humain

Le microbiote intestinal peut être considéré comme un organe, étant donné qu'il possède des fonctions spécifiques qui lui sont propres. En effet, le microbiote intestinal permet de maintenir l'homéostasie intestinale en transformant des éléments nutritifs non digérables par l'intestin en métabolites essentiels, en maintenant une barrière épithéliale efficace et en protégeant l'intestin de la colonisation par les pathogènes, ainsi qu'en participant au développement et fonctionnement du système immunitaire.

1. Activité métabolique du microbiote

Un grand nombre de métabolites sont produits par le microbiote grâce à la digestion d'éléments alimentaires (figure 20). Ces métabolites sont absorbés et utilisés par l'hôte, mais également par le microbiote lui-même et sont essentiels pour la santé et pour la conservation d'un microbiote sain et varié. La plupart des métabolites ont un effet bénéfique sur l'organisme et participent au maintien de l'homéostasie intestinale, cependant, certains composés, s'ils se retrouvent en trop forte concentration dans l'environnement intestinal, peuvent avoir un effet délétère sur la santé.

Le côlon est l'organe où se trouve la plus grande communauté de micro-organismes, c'est donc dans ce même organe que l'activité métabolique du microbiote est la plus forte. Plusieurs espèces bactériennes peuvent posséder les mêmes mécanismes métaboliques et donc sécréter les mêmes substrats. Cette multiplicité d'une même capacité métabolique est cruciale pour le maintien des activités métaboliques essentielles. Les principaux processus

métaboliques concernent la fermentation des glucides et des protéines, ces éléments sont les sources des métabolites les plus importants pour l'organisme.

Les glucides, également appelés polysaccharides, se présentent sous la forme de fibres alimentaires provenant de fruits, de légumes, de céréales. Ces fibres, provenant en majorité de la paroi des végétaux (cellulose, pectines...), n'ont pas pu être digérées par l' α -amylase, enzyme produite par l'organisme. Le microbiote intestinal, par la fermentation de ces fibres, va produire différents types de métabolites. Les acides gras à chaîne courte (AGCC), comme l'acétate, le propionate et le butyrate, sont absorbés à 95% par les colonocytes⁵⁹ et représentent une importante source d'énergie pour ces cellules, en particulier le butyrate, connu pour son action sur le renforcement de la barrière épithéliale. Le lactate, également issu de la fermentation des glucides par le microbiote, constitue un substrat pour les espèces sulfato-réductrices. Une accumulation de lactate dans l'intestin peut induire une synthèse accrue de sulfure, molécule nocive pour l'organisme⁶⁰. Néanmoins, le sulfure d'hydrogène, métabolite des micro-organismes sulfato-réducteurs, participe au contrôle de la motricité intestinale lorsqu'il est en faible quantité⁶¹.

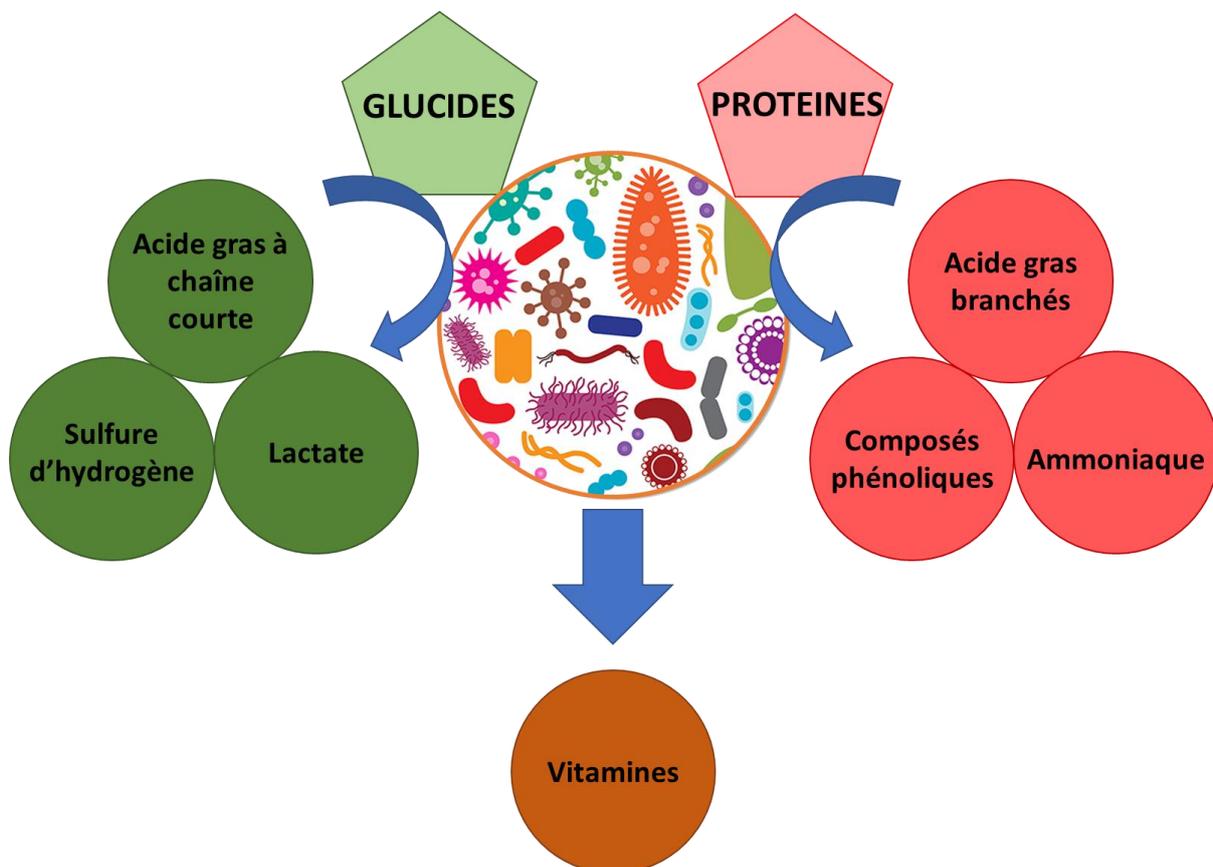


Figure 20 : Métabolisme du microbiote intestinal

Les protéines représentent la source d'azote principale du microbiote. Les peptides et les acides aminés issus de la fermentation des protéines par les micro-organismes sont utilisés aussi bien par l'hôte que par le microbiote. Plusieurs produits proviennent de cette activité métabolique, tel que l'ammoniaque, pouvant également servir de source d'azote pour le microbiote. Cependant, l'ammoniaque en forte concentration est toxique pour l'hôte et est potentiellement lié au développement du cancer colique⁶². Les acides gras branchés, comme l'isobutyrate et l'isovalérate, proviennent de la digestion des acides aminés branchés, leur présence dans le contenu fécal est le marqueur d'une activité protéolytique du microbiote⁵⁹. Enfin, les composés phénoliques, le phénol et l'indole par exemple, sont issus de la fermentation des acides aminés aromatiques et sont absorbés par la muqueuse.

La synthèse de vitamines est également une activité métabolique essentielle du microbiote. La ménaquinone (vitamine K2), la cobalamine (vitamine B12), la biotine (vitamine B8), et les vitamines B1, B2, B6, B9 sont importantes pour le maintien de l'organisme.

2. Protection et maintien de l'effet barrière

Plusieurs mécanismes permettent de maintenir une barrière entre les éléments présents dans la lumière intestinale et l'organisme, par effet direct ou indirect du microbiote :

Effets directs du microbiote intestinal (figure 21):

- **Compétition écologique** entre les bactéries commensales et les bactéries pathogènes opportunistes ou non. Les bactéries commensales utilisent les nutriments et colonisent les sites d'adhésion pour empêcher les bactéries pathogènes de s'implanter et/ou de croître.
- **Production de bactériocines** par les bactéries commensales. Ces toxines protéiques sont produites par les bactéries pour tuer ou inhiber la croissance bactérienne, permettant ainsi de réguler la population commensale ou encore de contrer les bactéries pathogènes. La Ruminococcine A par exemple, produite par la bactérie *Ruminococcus gnavus* est une bactériocine anti-clostridies pathogènes, dont fait partie *Clostridium perfringens*⁶³.
- **Transformation des acides biliaires** primaires en acides biliaires secondaires. Cette transformation se nomme la 7- α -déshydroxylation et permet à l'organisme de résister à la colonisation par des bactéries pathogènes. Grâce à cette activité, *Clostridium scindens* permet d'empêcher l'infection par *Clostridium difficile*⁶⁴.

Effets indirects du microbiote intestinal (figure 21):

- **Aide à la régulation de la production de mucus** par les commensales. Le mucus recouvre la muqueuse intestinale, il est composé de deux couches, une couche externe et une couche interne. La couche externe est celle en contact avec la lumière intestinale, c'est dans cette couche que l'on retrouve les bactéries. La couche interne est celle en contact avec la muqueuse, elle est très dense et empêche le contact entre les bactéries et la muqueuse. Le microbiote participe au maintien d'un nombre stable de cellules à mucus et de l'épaisseur du mucus, notamment en régulant la production des mucines grâce à certains produits bactériens, tel que le butyrate⁶⁵.
- **Production de peptides anti-microbiens** par les cellules épithéliales, tels que les défensines, les cathélicidines, les lysozymes et la lipocaline. Par l'action du microbiote, qui stimule les TLR (Toll-Like Receptor), les cellules épithéliales vont produire ces peptides. Les peptides anti-microbiens sont retrouvés en forte concentration dans le mucus et participe à la régulation des populations bactériennes dans l'intestin.

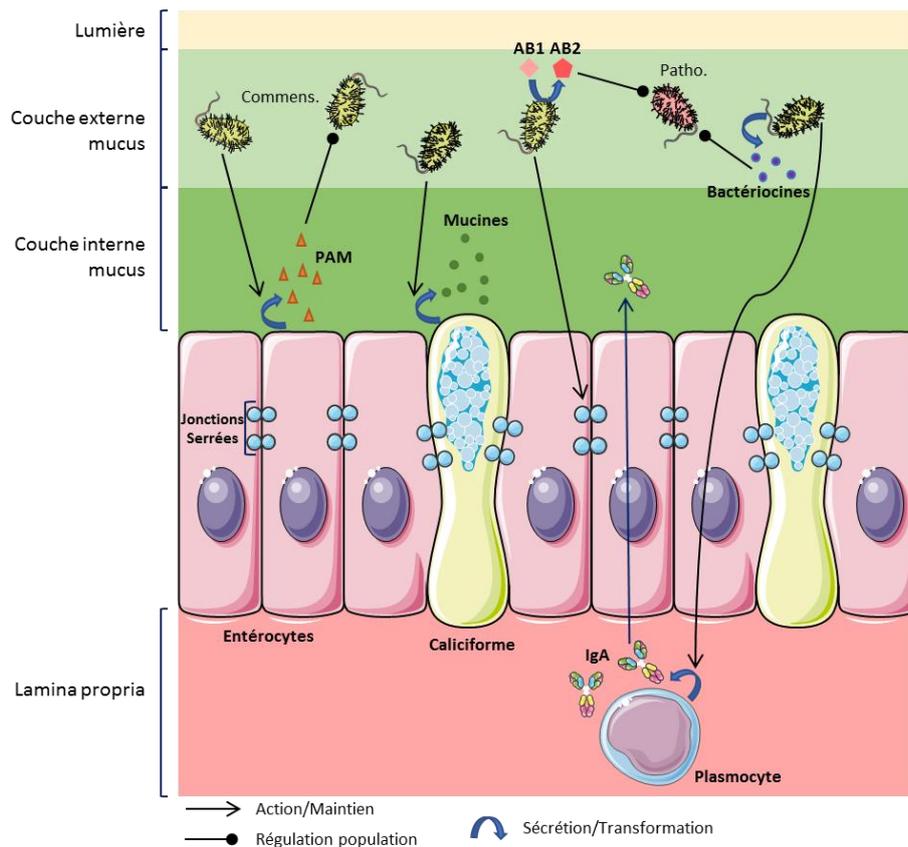


Figure 21 : Implication du microbiote dans le maintien d'une barrière efficace.
AB1 : Acide biliaire primaire ; AB2 : Acide biliaire secondaire ; PAM : Peptide anti-microbien ;
IgA : Immunoglobuline A
(inspirée par le livre « Le microbiote intestinal, un organe à part entière »⁵⁹)

- **Sécrétion d'immunoglobuline A (IgA)** par les plasmocytes intra-tissulaires. L'IgA est l'anticorps majoritairement retrouvé à la surface de la muqueuse. Sa sécrétion est induite par le microbiote afin de limiter le contact entre les bactéries et la muqueuse intestinale, elle agit sur les bactéries en provoquant leur disruption et leur agglutination et peut également neutraliser les toxines des bactéries pathogènes⁶⁶. Il est produit dans la lamina propria, puis est transporté vers la lumière intestinale par transcytose à travers les cellules épithéliales.
- **Maintien des jonctions serrées** par le microbiote. Les jonctions serrées empêchent le passage de micro-organismes (bons ou mauvais) et ainsi bloquent la translocation bactérienne dans le tissu. Le microbiote régule l'expression des gènes codants pour les protéines des jonctions serrées et participe donc au maintien de la barrière⁶⁷.
- **Participation à la réparation tissulaire** du microbiote. Il a été observé que sans microbiote, le renouvellement cellulaire est ralenti. En effet, la vitesse de progression des cellules épithéliales de la base vers le haut des cryptes est diminuée⁶⁸. De ce fait, la réparation est plus lente lorsque le microbiote est absent. Les mécanismes sous-jacents de cet effet reposent sur la stimulation des TLR qui va entraîner la production de cytokines et de facteurs cicatrisants par le tissu⁶⁹.

3. Développement et fonctionnement du système immunitaire

Le microbiote intestinal joue un rôle primordial dans le développement, la maturation et la régulation du système immunitaire local (intestin) et systémique, ainsi que dans le développement des tissus immunitaires intestinaux (plaques de Peyer et ganglions lymphatiques mésentériques)⁷⁰. Le système immunitaire intestinal est constamment exposé à une grande quantité de bactéries. Au fil de l'évolution, l'Homme a établi un lien symbiotique entre son système immunitaire et le microbiote. Les bactéries commensales sont tolérées par l'hôte et contribuent au bon fonctionnement de l'organisme, notamment en participant à l'établissement d'un système immunitaire fonctionnel et efficace.

La tolérance des bactéries commensales est possible grâce à plusieurs mécanismes mis en place par l'hôte. Les cellules dendritiques (CD) émettent leurs dendrites entre les cellules épithéliales pour capturer des bactéries commensales et présentent leurs antigènes bactériens aux lymphocytes T naïfs dans les ganglions mésentériques. Cette action induit l'activation de mécanismes de tolérance, tels que l'activation de CD tolérogènes CD103+ et la différenciation des LT naïfs en LTreg, producteurs de TGF- β et d'IL-10, cytokines

immunosuppressives⁷¹. Les cellules épithéliales possèdent des TLR capables d'interagir avec les bactéries lumineuses. Certains de ces TLR sont apicaux et sont stimulés continuellement par les bactéries commensales lumineuses, permettant de moduler la tolérance sans induire une réponse inflammatoire⁷². D'autres TLR sont baso-latéraux et sont activés lors d'une effraction de la barrière épithéliale par des bactéries. Le mécanisme de défense est alors activé afin de résister à la colonisation mucoale si des agents pathogènes sont détectés (facteurs de virulence pour favoriser le passage trans ou intra épithéliale)⁷² ou si un certain seuil quantitatif bactérien est atteint dans la sous-muqueuse (pour les bactéries pathogènes et commensales, en cas de brèche dans la barrière)⁷³. Les lymphocytes Th17 interviennent alors pour contrer cette invasion dans la sous-muqueuse, provoquant une inflammation. Les ILC agissent également par la sécrétion d'IL-22 qui va induire la sécrétion de peptides anti-microbiens par les cellules épithéliales⁷⁴.

Les interactions entre le microbiote et l'hôte ont pu être observées grâce à de nombreuses études comparant le système immunitaire d'animaux axéniques, également appelés germ-free (sans microbiote intestinal) et conventionnels (possédant un microbiote).

Les deux catégories de cellules immunitaires, innées et adaptatives, sont toutes deux régulées par le microbiote. Leur développement, leur polarisation, leur capacité sécrétoire ou encore leur nombre sont fortement influencés par la présence de bactéries commensales dans l'intestin.

Effets du microbiote sur l'immunité innée (figure 22):

Neutrophiles

Le microbiote agit sur l'activité des neutrophiles, notamment en augmentant l'efficacité bactéricide des neutrophiles résidents et circulants, à l'aide de certains composants bactériens (peptidoglycane⁷⁵) ou de métabolites (AGCC)⁷⁶, permettant ainsi de protéger l'intestin de l'infection de pathogènes. Un autre mécanisme intéressant de protection contre la colonisation de pathogènes a été mis en lumière par Hasegawa et al. en 2012⁷⁷ : Lors d'une infection à *Clostridium difficile*, les bactéries commensales vont pénétrer dans la muqueuse par translocation. Cette translocation va induire l'expression d'IL-1 β , nécessaire au recrutement des neutrophiles. Les neutrophiles, venant dans un premier temps pour éliminer les bactéries transloquées, vont alors pouvoir aussi éliminer le pathogène⁷⁷.

Macrophages

La fonction protectrice des macrophages résidents est régulée par la présence du microbiote intestinal, plus précisément par l'augmentation de la production du précurseur pro-IL1 β (forme immature de l'IL-1 β)⁷⁸. Cependant, les macrophages doivent entrer en contact avec des pathogènes, tels que *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa* pour finaliser le processus de maturation de l'IL-1 β et ainsi éliminer les pathogènes infectieux⁷⁸. Les fonctions anti-inflammatoires des macrophages intestinaux sont également modulées par le microbiote, qui peut induire une production d'IL-10, cytokine importante pour l'homéostasie intestinale⁷⁹.

Cellules dendritiques

Les CD représentent le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif. En présentant des antigènes aux cellules T CD4+ naïfs, elles induisent une polarisation et une différenciation spécifique à ces dernières. L'activation des CD, leur survie et leur maturation sont des processus fortement influencés par leur environnement, dont le microbiote. Les bactéries commensales, notamment par la sécrétion de métabolites spécifiques (comme le butyrate et les acides biliaires secondaires⁸⁰), sont capables de moduler le fonctionnement des CD, en modifiant leur profil sécrétoire⁸¹ et en régulant leur capacité à présenter des antigènes aux cellules T (et donc de contrôler la différenciation des cellules T)⁸².

Cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC), population de lymphocytes sans récepteurs d'antigène spécifique et abondants dans la lamina propria colique, sont aussi impactées par la présence ou non de microbiote. En effet, des études récentes suggèrent que le bon développement et fonctionnement de ces cellules dépendraient du microbiote⁸³. Les ILC sont capables de sécréter des cytokines, pour exécuter leur rôle dans la résistance face à la surcroissance du microbiote et à l'invasion de pathogènes⁸⁴. Il existe trois sous-populations d'ILC, nommées ILC 1, 2 et 3, qui vont chacune avoir des fonctions spécifiques. La sous-population ayant démontré le plus de liens avec le microbiote est l'ILC3, montrant des ressemblances avec les lymphocytes TH17, notamment par rapport à leur marqueur membranaire commun, ROR γ t, et à leur profil sécrétoire semblable, telles que les cytokines IL-17 et IL-22.

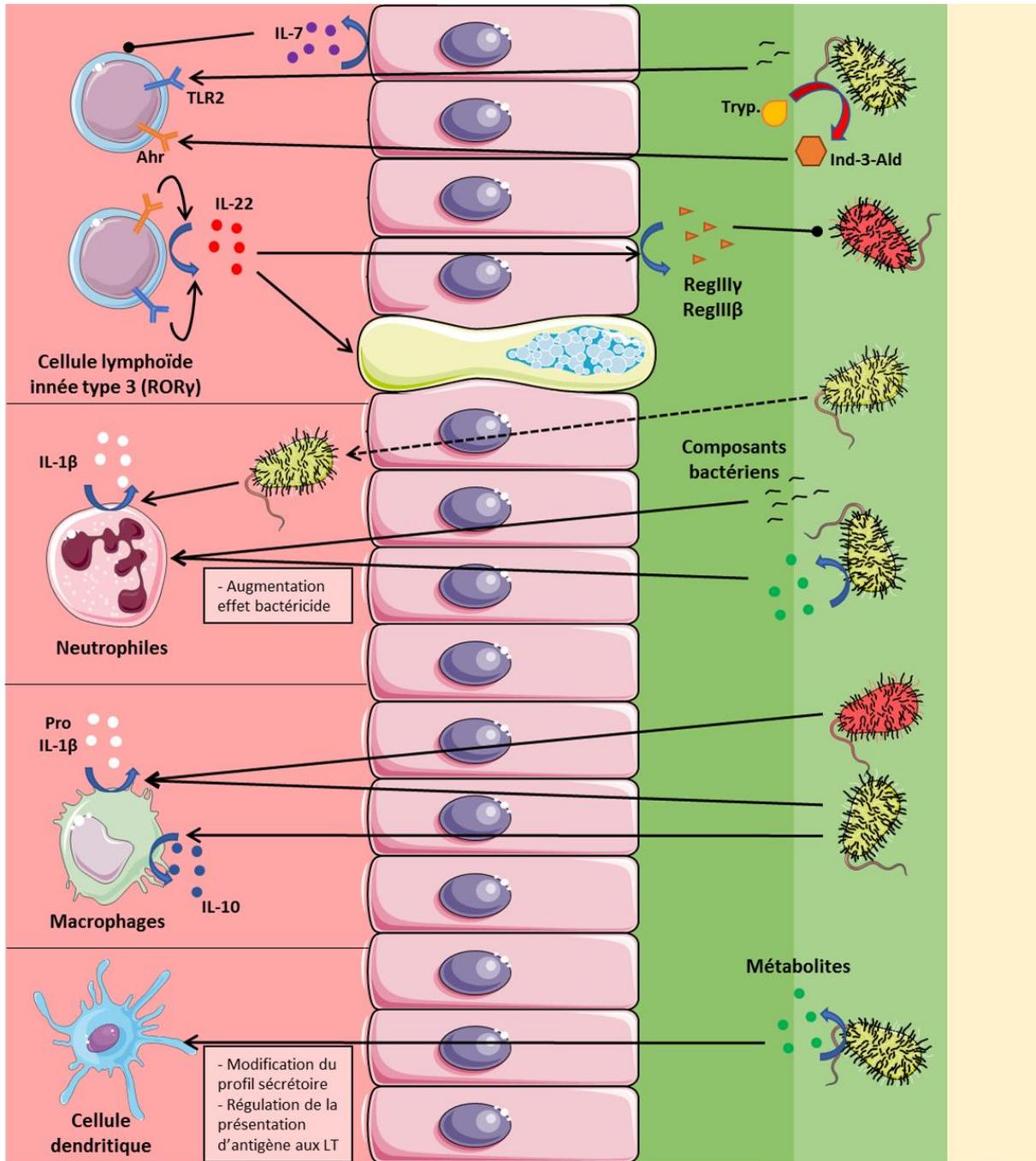


Figure 22 : Implication du microbiote dans le développement et le fonctionnement des cellules du système immunitaire inné.

Tryp. : Tryptophane ; Ind-3-Ald : Indole-3-aldéhyde.

Bactérie verte = commensale, bactérie rouge = pathogène

L'IL-22 appartient à la famille de l'IL-10 et est impliquée dans l'expression de peptides antimicrobiens (RegIII γ et RegIII β), peptides importants pour limiter l'expansion bactérienne⁸⁵. Elle aide également à favoriser la colonisation des bactéries bénéfiques dans le microbiote et participe à la prolifération des cellules caliciformes^{85,86}. De plus, le manque d'IL-22 a été associé à l'apparition de pathologies, notamment infectieuses⁸⁷.

Les ILC3 expriment les TLR1, 2, et 6, et la stimulation du TLR2 par des ligands bactériens induit la production d'IL-22⁸⁸. La sécrétion de métabolites par le microbiote agit également sur la sécrétion de cytokines par les ILC. Les catabolites issus de la transformation du tryptophane par les bactéries, tel que l'indole-3-aldéhyde, sont des agonistes du récepteur aryl hydrocarbon (Ahr). Ce facteur de transcription, présent dans les ILC, active la production d'IL-22^{89,90}.

De plus, le microbiote participe au maintien d'un nombre optimal d'ILC de type 3. En effet, il stimule la sécrétion d'IL-7 par les cellules épithéliales. L'IL-7 permet notamment de stabiliser l'expression de ROR γ t, marqueur cellulaire spécifique des ILC3. Il a été démontré que les souris axéniques sécrètent peu d'IL-7, par conséquent, les taux d'ILC3 sont faibles. Ce nombre réduit d'ILC3 conduit à la prolifération d'ILC producteurs d'IFN- γ , facilitant l'apparition d'inflammation intestinale⁹¹.

Effets du microbiote sur l'immunité adaptative (figure 23) :

Lymphocytes B et IgA

Comme vu précédemment sur l'effet du microbiote sur la barrière intestinale, le microbiote est capable d'influencer la production d'IgA, démontrant une activité d'autocontrôle du microbiote sur sa propre population. Le microbiote intestinal participe à la formation et au développement des tissus lymphoïdes secondaires, tels que les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques. Les cellules productrices d'IgA sont originaires de ces tissus, c'est au même endroit que se passe la maturation des IgA, par stimulation par le microbiote⁹². Il a été observé que le nombre de cellules plasmiques IgA+ (capable de sécréter des IgA) est diminué chez des souris germ-free^{93,94}. En effet, sans signaux microbiens, la maturation des centres germinaux dans les plaques de Peyer n'est pas possible et la formation de cellules B productrices d'IgA en est diminuée⁹².

Sous l'effet du microbiote, les CD folliculaires présentes dans les plaques de Peyer sécrètent du TGF β , du CXCL13 et du BAFF (B-cell Activating Factor)⁹⁵. Ces facteurs vont influencer la

différenciation des lymphocytes B en productrices d'IgA et ainsi, augmenter la production d'IgA⁹⁵. Les CD présentes dans la lamina propria vont également réagir aux signaux bactériens en produisant de l'acide rétinoïque, du TGFβ, du TNFα, de l'iNOS et du BAFF, favorisant également la formation de cellules B IgA^{96,97}. Les métabolites issus du microbiote jouent également un rôle dans l'activation, la différenciation et la production d'anticorps par les lymphocytes B, comme les AGCC ou l'acide rétinoïque⁹⁸.

Lymphocytes Th17 et Treg

Le microbiote régit l'équilibre entre les différentes populations de lymphocytes T, plus particulièrement les populations de lymphocytes Th17 et Treg. Il participe à la différenciation et à la définition des fonctions des lymphocytes T, par le biais de métabolites ou de cytokines sécrétées par les cellules épithéliales, dendritiques et les macrophages sous l'influence de signaux bactériens.

Les lymphocytes Th17 ont un rôle dans la défense contre les micro-organismes et, dans certains cas, peuvent participer au développement de maladies auto-immunes. Certaines bactéries peuvent induire le développement des lymphocytes Th17. La SFB (Segmented Filamentous Bacteria), une espèce bactérienne faisant partie des Clostridia, a démontré une capacité à induire le développement de Th17 dans l'intestin⁹⁹. Cette bactérie active les CD, qui vont induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th17^{100,101}. Ces lymphocytes Th17 ne déclenchent pas d'inflammation, ils participent à la protection contre l'invasion d'espèces infectieuses¹⁰¹. Des études sur les souris germ-free ou traités par antibiotiques ont démontré que ces animaux présentent un nombre réduit de Th17, tandis que la recolonisation par SFB d'animaux axéniques rétablit une population normale de Th17¹⁰². L'un des mécanismes pouvant expliquer l'effet du microbiote sur la différenciation passe par la production d'IL-1β. Les bactéries commensales induisent la production d'IL-1β par les macrophages résidents, cette cytokine va alors induire le développement des lymphocytes Th17¹⁰³. La SFB pourrait également influencer le développement des Th17 en activant la sécrétion de protéines de sérum amyloïde A par les cellules épithéliales¹⁰⁰.

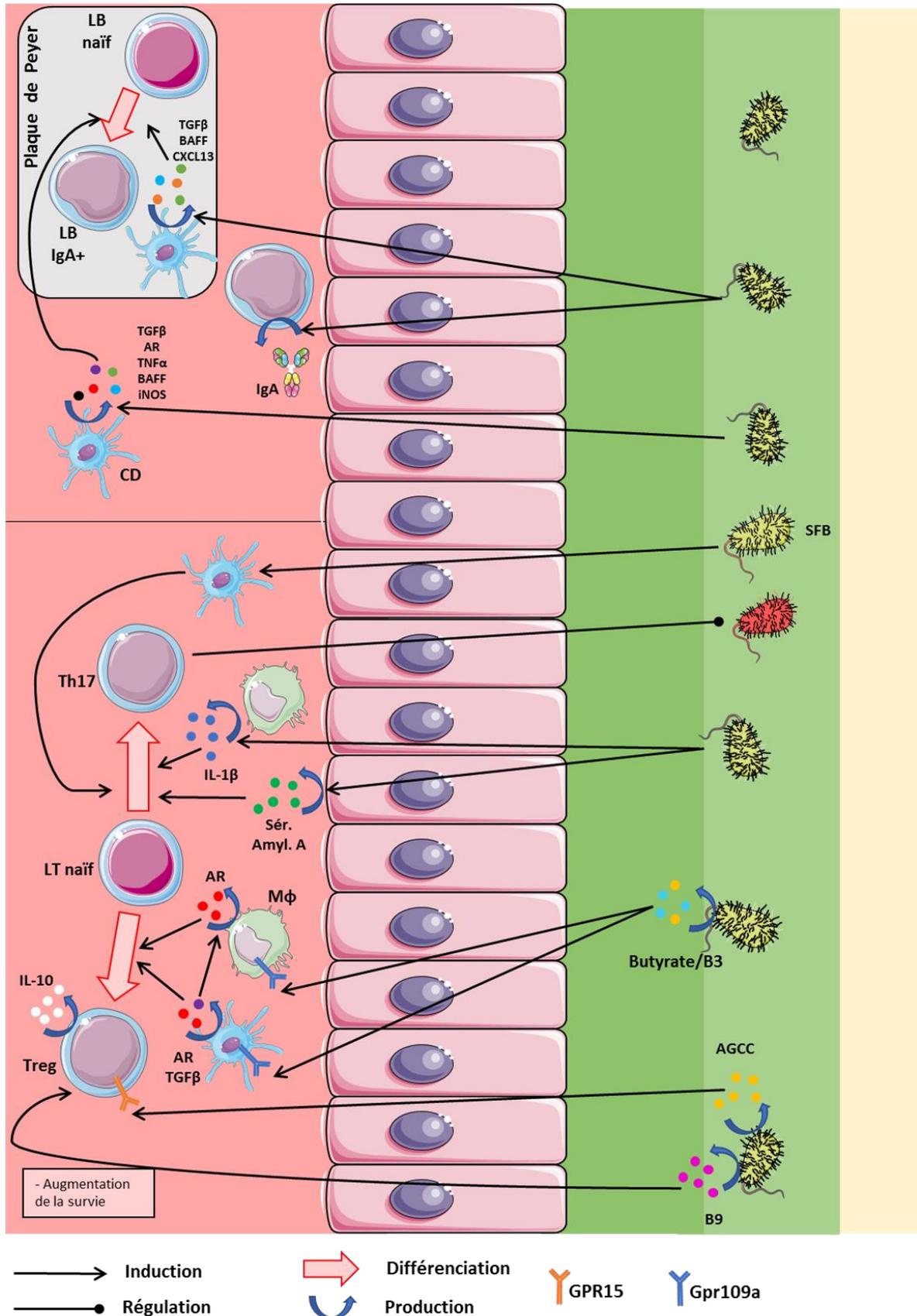


Figure 23 : Implication du microbiote dans le développement et le fonctionnement des cellules du système immunitaire adaptatif.

AGCC : Acide gras à chaîne courte ; AR : Acide rétinoïque ; B3 : Vitamine B3/Niacine ; B9 : Vitamine B9/Acide folique ; CD : Cellule dendritique ; IgA : Immunoglobuline A ; LB : Lymphocyte B ; LT : Lymphocyte T ; Mφ : Macrophage ; Sér. Amyl. A : Sérum amyloïde A ; SFB : Segmented Filamentous Bacteria

Les lymphocytes Treg sont importants pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Les Treg peuvent être périphériques, c'est-à-dire qu'ils sont issus de l'expansion de Treg intestinaux (pTreg) ou ils peuvent provenir du thymus (tTreg). Le marqueur membranaire Helios permet de les différencier, les pTreg sont Helios⁻ et les tTreg sont Helios⁺. Dans un modèle de souris axéniques, il a été démontré que la population de pTreg est diminuée dans la lamina propria du côlon, tandis que les populations tTreg ne montrent pas de différence avec les souris conventionnelles¹⁰⁴. La recolonisation de ces souris par un microbiote intestinal conduit à la restauration d'une population normale de Treg, démontrant l'implication du microbiote dans le maintien de l'équilibre des populations de lymphocytes T¹⁰⁵. Cet effet est encore plus important en présence d'espèces de Clostridia (notamment les clusters IV et XIV) et de la bactérie *Bacteroides fragilis*, qui augmentent les populations de Treg et la production d'IL-10¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

L'induction de Treg par les bactéries implique la sécrétion de métabolites, dont les AGCC. En effet, chez des animaux germ-free, peu d'AGCC sont retrouvés et la population de Treg est faible^{108,109}. Lors de la recolonisation de ces animaux avec un microbiote, le taux d'AGCC et le nombre de Treg augmentent¹¹⁰. Sous ce constat se cache un mécanisme aux multiples intervenants : Les CD et les macrophages résidents possèdent un récepteur de la famille des GPR, le Gpr109a. Ce récepteur va être activé par les métabolites bactériens, tels que le butyrate (AGCC) ou la niacine (vitamine B3)¹¹¹. Suite à cette activation, les CD vont produire de l'acide rétinoïque et du TGFβ, tandis que les macrophages vont produire de l'acide rétinoïque^{112,113}. Ces deux molécules sont importantes pour la différenciation des lymphocytes T en Treg¹¹⁴. Ainsi, par le biais d'une cascade d'évènements, les métabolites bactériens sont capables d'induire le développement des Treg.

Un autre récepteur est impliqué dans la communication entre les Treg et le microbiote, il s'agit du GPR15, exprimé par les Treg et impliqué dans la migration de ces cellules dans l'intestin grêle¹¹⁵. Chez des souris déplétées pour ce récepteur, peu de Treg sont retrouvés dans l'intestin grêle¹¹⁵. Lorsque des souris conventionnelles sont traitées par des antibiotiques à large spectre, l'expression en GPR15 est faible¹¹⁵. L'expression de GPR15 est induite par l'administration d'AGCC, ainsi, les bactéries permettent la migration des Treg vers l'intestin grâce à leurs métabolites¹⁰⁸.

Enfin, la vitamine B9, également connue sous le nom d'acide folique, est une molécule impliquée dans la survie des Treg dans le côlon¹¹⁶. Cette molécule ne peut pas être produite

par l'Homme, qui ne possède pas les voies de synthèse nécessaire à sa production. De ce fait, l'acide folique est produit par les bactéries commensales, parmi lesquelles les Bifidobacteria et les Lactobacilli¹¹⁷.

Les différentes fonctions portées par le microbiote témoignent de son importance dans l'homéostasie intestinale et donc pour la santé générale de l'hôte. C'est grâce à l'équilibre établi entre le microbiote et l'hôte, mais également entre les différentes populations de micro-organismes au sein du microbiote, que les différents processus fonctionnent et se maintiennent. Mais que se passe-t-il lorsque ces équilibres sont rompus ? Lorsque les espèces nécessaires à la santé disparaissent ? Le phénomène de dysbiose, qui peut être perçu comme une perte de la symbiose installée entre le microbiote et l'hôte⁵⁹, est fortement lié au développement de pathologies. En effet, la perte de métabolites produits par le microbiote et nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale, la dégradation de la barrière établie grâce au microbiote et la rupture de la tolérance entre le microbiote et le système immunitaire, induisent des dommages importants sur l'organisme.

II. Dysbiose du microbiote intestinal après radiothérapie

A. Notion de dysbiose

L'homéostasie intestinale repose sur l'équilibre entre l'hôte et son microbiote, la symbiose. Lors d'une dysbiose, les fonctions remplies par le microbiote sont perdues et les conséquences sur l'organisme sont importantes. En conditions normales, le microbiote est toléré par l'organisme. En conditions pathologiques, cette tolérance semble altérée, ce qui induit un déséquilibre de l'homéostasie.

Trois phénomènes définissent la dysbiose : La diminution des populations commensales/bénéfiques, l'expansion des bactéries pathogènes et la perte de diversité (figure 24). Ces trois changements semblent intimement liés. En effet, la perte de la diversité microbienne est due à la disparition des bactéries commensales, qui va donc faciliter le développement des bactéries pathogènes opportunistes. Ce déséquilibre du microbiote se traduit par l'apparition de différentes anomalies, comme la diminution de la quantité d'AGCC (en particulier le butyrate), la dégradation de la couche de mucus, la diminution de la production d'hydrogène et de méthane, l'augmentation de la production de sulfure d'hydrogène (H₂S), toxique pour l'épithélium et la sécrétion d'endotoxines (comme le LPS), notamment par le phylum Proteobacteria, participant à l'aggravation de l'inflammation.

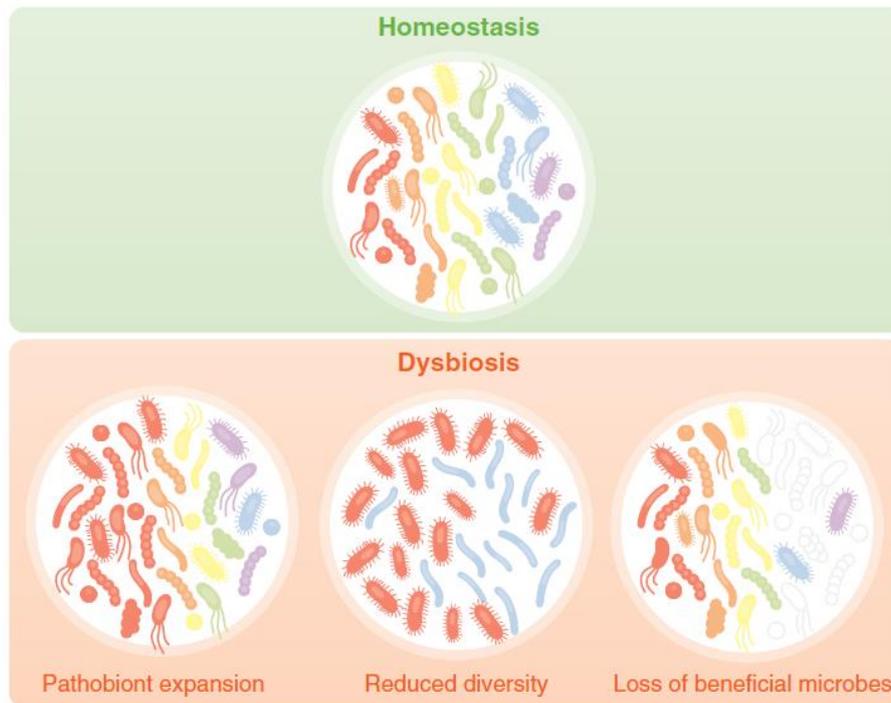


Figure 24 : Les différents phénomènes de dysbiose¹¹⁸

Plusieurs facteurs peuvent influencer la structure du microbiote. Ils peuvent être endogènes, comme le genre, l'âge, le génotype, le stress psychologique et l'état de santé général de l'individu. Les composants environnementaux engendrent également des fluctuations dans les populations du microbiote. Parmi ces composants, l'alimentation, l'habitat et le mode de vie ainsi que l'apport médicamenteux peuvent modifier le microbiote, de façon temporaire ou permanente (voir annexe 1 : Influence des facteurs exogènes sur la composition du microbiote).

La dysbiose intestinale est associée à de nombreuses pathologies, comme les pathologies inflammatoires intestinales (IBD, IBS)^{119,120}, les pathologies métaboliques (obésité, diabète)^{121,122}, les pathologies neurologiques (maladie d'Alzheimer, autisme, maladie de Parkinson)¹²³⁻¹²⁵ ainsi que certains cancers^{126,127}. Le microbiote chez les patients traités par radiothérapie est également altéré, l'analyse clinique et pré-clinique a permis d'étudier les changements dans la composition du microbiote et de rechercher des méthodes thérapeutiques pour contrer l'apparition de cette dysbiose radio-induite.

B. Dysbiose après radiothérapie

H. J Andreyev, à l'origine de la définition de la Pelvic Radiation Disease, pose l'hypothèse du rôle du microbiote dans la pathogenèse en 2014⁵³. Plusieurs études cliniques ont permis de démontrer la véracité de cette hypothèse, par l'analyse du microbiote d'individus ayant reçu

une irradiation pelvienne. Une modification de la composition du microbiote a effectivement été découverte après radiothérapie pelvienne.

1. Composition du microbiote après irradiation pelvienne

La première observation générale sur les changements du microbiote en clinique est la diminution de la diversité du microbiote fécal après irradiation^{128,129}.

| Année/Auteurs | Patients | Type cancer | Traitement | Type d'analyse |
|--|---|---|---|---|
| 2008 Manichanh C. et al ¹³⁰ | 10 Hommes et Femmes 50-71 ans 4-5 Contrôles 32-85 ans | Rectum, utérus, col de l'utérus, endomètre | - Radiothérapie pelvienne - 180-200cGy par fraction - Normofractionnée <u>Exclusion si:</u> Antibiotiques, stéroïdes, immunosuppresseurs | Analyse fécale ARNr 16S Prélèvements avant RT, entre 2 ^e et 3 ^e semaine de RT, fin de RT et 2S après fin RT Questionnaire de grade de diarrhée (CTC) |
| 2013 Nam YD. et al ¹³² | 9 Femmes 45-64 ans | Cancer gynécologique (col de l'utérus et endomètre) | - Radiothérapie pelvienne - Dose totale : 50,4Gy - Normofractionnée - Chimiothérapie (7 patientes/9) <u>Exclusion si:</u> Antibiotiques, stéroïdes, immunosuppresseurs | Analyse fécale ARNr 16S Prélèvements 1S avant RT, après 1 ^{ère} séance de RT, après dernière séance de RT et après fin RT (1 à 3 mois après) |
| 2015 Wang A. et al ¹²⁹ | 20 Hommes et Femmes 45-65 ans 4 Contrôles | Col de l'utérus, anal, colorectal | - Radiothérapie pelvienne - Dose totale : 44-50Gy <u>Exclusion si:</u> Chimiothérapie, antibiotiques, stéroïdes, immunosuppresseurs | Analyse fécale ARNr 16S Prélèvements avant RT et après fin RT Questionnaire de grade de diarrhée (CTCAE) + analyse fatigue |
| 2019 Wang Z. et al ¹³¹ | 18 Femmes 30-67 ans | Col de l'utérus | - Radiothérapie pelvienne sans chimiothérapie et chirurgie - Dose totale : 50,4Gy 1,8Gy/fraction <u>Exclusion si:</u> Antibiotiques, probiotiques, inhibiteurs de pompes à proton, entérite récente, maladie auto-immune, patients de moins de 18 ans, régime végétarien, IMC anormal, historique de cancer | Analyse fécale ARNr 16S Prélèvements avant RT et après fin RT Analyse symptômes cliniques : Douleurs, ténesme, hémorragie, incontinence fécale, diarrhée, vomissement |

Tableau 6 : Liste des études cliniques utilisées dans cette analyse de la dysbiose radio-induite

La comparaison du microbiote avant et après la radiothérapie a montré des changements relatifs à certains phyla, familles et genres bactériens des patients (tableau 7). Parmi les phyla dont l'abondance change après radiothérapie, les Firmicutes et les Bacteroidetes sont diminués et les Actinobacteria, Proteobacteria et Fusobacteria sont augmentés. Les populations des genres Lachnospiraceae, Roseburia, Oscillibacter, Streptococcus et Faecalibacterium sont plus faibles après irradiation pelvienne, tandis que celles des genres Bacteroides et Clostridium XVIa sont plus élevées.

| Diminution de la population après RT | | Augmentation de la population après RT | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------|
| Phylum | Firmicutes ^{129,131,132} | Phylum | Actinobacteria ¹³⁰ |
| Phylum | Bacteroidetes ^{129,131,132} | Phylum | Proteobacteria ¹³¹ |
| Genre | Lachnospiraceae ^{129,131} | Phylum | Fusobacteria ¹³² |
| Genre | Roseburia ¹²⁹ | Famille | Streptococcaceae ¹²⁹ |
| Genre | Oscillibacter ¹²⁹ | Genre | Bacteroides ¹²⁹ |
| Genre | Streptococcus ¹²⁹ | Genre | Clostridium XVIa ¹²⁹ |
| Genre | Faecalibacterium ¹²⁹ | | |

Tableau 7 : Modification du microbiote chez les patients traités par radiothérapie pelvienne¹²⁹⁻¹³²

Il a également été observé une différence dans la composition du microbiote des patients traités par radiothérapie pelvienne présentant ou non des symptômes de colopathie radique. En effet, non seulement les patients ayant des diarrhées post-radiothérapie possèdent un microbiote différent de ceux n'en n'ayant pas, mais leur microbiote avant la radiothérapie est également différent de celui n'ayant pas développé de diarrhées.

La perte de diversité est beaucoup plus forte chez les patients diarrhéiques après irradiation¹²⁹. En effet leur microbiote post-radiothérapie ne partage plus que 29% de similarité avec leur microbiote pré-radiothérapie, tandis que le microbiote des patients non diarrhéiques après radiothérapie est similaire à 60% à leur microbiote avant irradiation, comme pour les individus contrôles¹³⁰.

| Avant radiothérapie pelvienne | | | | Après radiothérapie pelvienne | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| Diminution de la population chez ER | | Augmentation de la population chez ER | | Diminution de la population chez ER | | Augmentation de la population chez ER | |
| G | Faecalibacterium ¹²⁹ | G | Veilonella ¹²⁹ | G | Sutterella ¹²⁹ | P | Proteobacteria ¹³¹ |
| G | Clostridia XVIII ¹²⁹ | G | Bacteroides ¹²⁹ | G | Bacteroides ¹³¹ | P | Actinobacteria ¹³⁰ |
| G | Prevotella ¹²⁹ | G | Coprococcus ¹³¹ | G | Blautia ¹³¹ | G | Escherichia ¹²⁹ |
| G | Oscillibacter ¹²⁹ | | | G | Ruminococcaceae ¹³¹ | G | Bacteroides ^{129, 131} |
| G | Dialister ¹²⁹ | | | | | G | Alistipes ¹²⁹ |
| G | Clostridium XI ¹²⁹ | | | | | G | Clostridium XI ¹²⁹ |
| | | | | | | G | Megamonas ¹²⁹ |
| | | | | | | G | Lachnospiraceae ¹²⁹ |

Tableau 8 : Modification du microbiote chez les patients traités par radiothérapie pelvienne et souffrant d'entérite radique¹²⁹⁻¹³¹

Parmi les changements de microbiote avant et après radiothérapie chez les patients souffrant de diarrhées post-radiothérapie (tableau 8), on observe la diminution du genre *Faecalibacterium* avant radiothérapie, dont fait partie *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérie commensale très importante pour l'homéostasie intestinale. Le phylum Proteobacteria, comprenant les pathogènes *E. Coli*, *Shigella* et *Klebsiella*, est augmenté après radiothérapie chez les patients diarrhéiques, par rapport aux patients non diarrhéiques.

Cette différenciation des microbiotes pré-radiothérapie entre les patients atteints de colopathie radique et les patients non atteints laisse à penser que le microbiote jouerait un rôle important dans le développement de la pathologie. Plus important encore, il serait possible de déterminer, grâce à l'analyse du microbiote avant irradiation, si le patient est susceptible de développer une colopathie radique et ainsi, agir en prévention sur le microbiote pour empêcher l'apparition de symptômes.

Ces résultats cliniques sur les changements de la composition et de la richesse du microbiote chez les patients traités par radiothérapie pelvienne apportent de nouvelles informations sur l'implication du microbiote dans le développement de colite radique. Cependant, un plus grand nombre d'études cliniques est nécessaire pour déterminer quelles sont les altérations du microbiote significativement liées à l'apparition de toxicité intestinale radio-induite. Les résultats observés dans les quelques études concernent de très faibles cohortes de patients (études sur une dizaine ou vingtaine de patients) et l'hétérogénéité microbienne des patients entraîne des résultats très différents entre les études. De plus, les études concernent des

patients atteints de cancers différents (cancers gynécologiques, ou colorectal, parfois une même étude comprend différents types de cancers). Enfin, bien que les études comportent des critères d'exclusion sur la prise de traitements pouvant altérer le microbiote (antibiotiques, immunosuppresseurs, stéroïdes), certaines ne précisent pas si le suivi d'une chimiothérapie est un critère d'exclusion, or il a été démontré que la chimiothérapie pouvait induire une altération du microbiote¹³³.

L'analyse clinique de la corrélation entre dysbiose et pathogenèse semble complexe. En effet, un suivi à long terme du microbiote d'individus est nécessaire pour comprendre la causalité d'un changement du microbiote dans le développement de la pathologie. La prédisposition génétique est également un point important à étudier. L'étude du microbiote d'individus génétiquement susceptibles de développer ce type de maladie pourrait étayer les données sur le rôle du microbiote.

2. Dysbiose après irradiation : Cause ou conséquence de la pathogenèse ?

De nombreuses études débâtent du fait que la dysbiose soit une cause ou une conséquence de le PRD. Plusieurs hypothèses existent sur le rôle que pourrait jouer le microbiote dans la pathogenèse (figure 25) :

- Hypothèse I : La dysbiose serait une conséquence liée à l'hôte et à des circonstances environnementales, elle ne serait pas impliquée dans l'apparition de la pathologie. La dysbiose arriverait en parallèle de la pathologie et n'aurait pas de rôle dans son développement. Agir sur le microbiote pour contrecarrer la dysbiose n'aurait alors aucun effet sur la pathologie, ni les symptômes.
- Hypothèse II : La dysbiose serait une conséquence de la pathologie (ou du traitement de la pathologie), elle serait un effet secondaire et contribuerait à la sévérité et à la chronicité de la maladie. Dans le cas présent, rétablir la symbiose entre le microbiote et l'hôte permettrait de soigner les symptômes de la pathologie, mais ne stopperait pas son évolution.
- Hypothèse III : La dysbiose serait une des causes primaires de l'apparition de la pathologie, le changement dans le microbiote serait la cause initiatrice de la maladie. Restaurer le microbiote permettrait alors d'améliorer l'état de santé en rétablissant l'homéostasie.

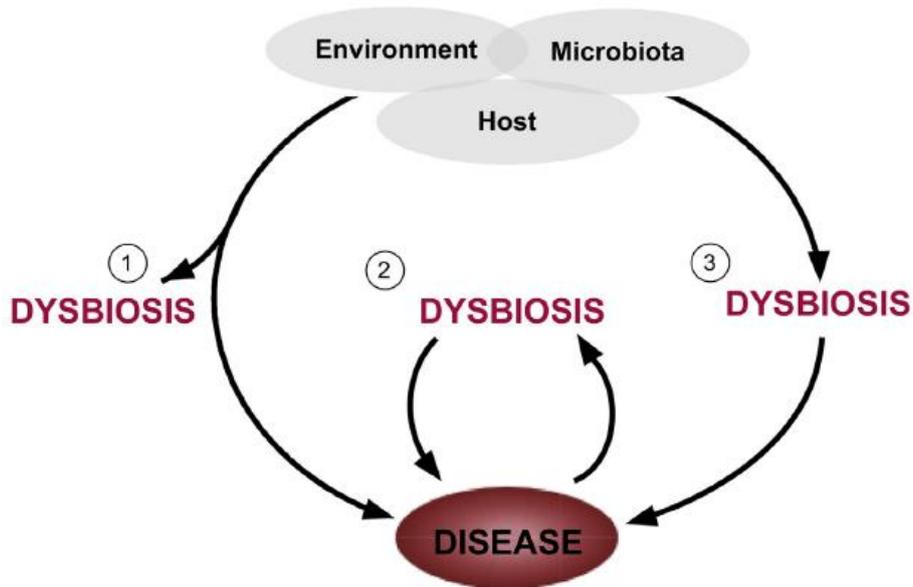


Figure 25 : Hypothèses sur le rôle de la dysbiose dans la pathogenèse¹³⁴

Chaque pathologie se développe selon un mécanisme différent. Le rôle que joue le microbiote dans ce développement est donc dépendant du type de pathologie étudié. Dans cette sous-partie, nous étudierons l'impact de la dysbiose dans le cas de la PRD.

L'hypothèse I ne semble pas valide dans le cas de la PRD. En effet, il a été démontré dans de nombreuses études qu'une action sur le microbiote par des antibiotiques¹³⁵, des probiotiques¹³⁶ ou des prébiotiques¹³⁷ permet une amélioration de l'état de santé.

Se pose désormais la question de l'implication du microbiote dans la pathogenèse de la toxicité intestinale radio-induite. La dysbiose est-elle une conséquence (Hypothèse II) ou une cause (Hypothèse III) de cette toxicité ? L'inflammation chronique est l'un des phénomènes les plus importants dans ce type de pathologie. Cette inflammation, qui se déclencherait alors indépendamment du microbiote, est-elle responsable de la dysbiose ou la dysbiose est-elle l'initiatrice de l'inflammation ?

L'analyse du mécanisme impliquant le microbiote dans l'apparition de colite radique a été possible grâce aux études pré-cliniques. Ces études ont notamment aidé à comprendre les conséquences biologiques de la dysbiose radio-induite sur l'épithélium colique et le système immunitaire.

Une étude intéressante a démontré l'implication du microbiote dans l'apparition des lésions radiques intestinales grâce à des souris germ free¹³⁸. Ces souris germ free ont résisté à une

irradiation en corps entier de 16Gy, tandis que 44% des souris « conventionnalisées » (germ free + microbiote de souris conventionnelle) irradiées de la même façon sont mortes 7 jours après irradiation. De plus, les souris germ free irradiées ne montraient pas de lésions intestinales histologiques 14 jours après l'irradiation, tandis que les souris conventionnalisées et conventionnelles possédaient les lésions habituellement observées après irradiation. Étonnamment, des souris germ free colonisées par deux souches bactériennes, *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Escherichia coli*, ont conservé leur radiorésistance. Ce résultat pourrait signifier que ces deux souches ne suffisent pas à déclencher une réponse à l'irradiation, un microbiote plus complexe et plus diversifié est nécessaire à la pathogénèse.

Pour mieux comprendre par quel mécanisme le microbiote influence la radiosensibilité de l'intestin, Gerassy-Vainberg *et al.* ont récemment étudié la transplantation fécale pré-clinique de souris irradiées vers des souris germ free¹³⁹. Dans un premier temps, l'équipe a étudié la dysbiose produite par l'irradiation. Le phylum Proteobacteria est augmenté et le phylum Firmicutes est diminué, comme il a été observé en clinique. La greffe de microbiote fécal de souris irradiées vers une souris germ free a mené à la sensibilisation exacerbée du côlon à l'irradiation, illustrée par une augmentation du score lésionnel et de la production d'IL-1 β , en comparaison à une souris germ free greffée avec un microbiote de souris conventionnelle non irradiée. Les résultats sont similaires avec un challenge au DSS, les souris développent une colite plus sévère avec le microbiote de souris irradiée. Cette observation a été validée *in vitro*, en étudiant l'effet de l'ajout de suspension fécale de souris 6 semaines après irradiation ou non irradiées sur des cellules HT29. Après quelques heures, les cellules en contact avec la suspension fécale d'animaux irradiés ont produit du TNF α et de l'IL-1 β en plus grande quantité qu'avec la suspension fécale non irradiée. Enfin, le traitement de souris par un antagoniste de l'IL-1 β diminue les lésions causées par l'irradiation ainsi que la production de TNF α , démontrant un mécanisme du microbiote lié à l'IL-1 β .

Des études pré-cliniques supplémentaires sur les souches associées à l'apparition de la toxicité intestinale radio-induite en clinique sont néanmoins nécessaires. Dans le cas des pathologies inflammatoires intestinales, des analyses sur l'effet de l'inoculation de bactéries liées à la pathogénèse ont été effectuées. Une étude a démontré que la colonisation par une seule souche humaine (mono colonisation) retrouvée dans le microbiote de patients atteints de maladie de Crohn (*E. coli* LF82), chez la souris germ free, exacerbe l'inflammation colique induite par DSS¹⁴⁰. Une autre équipe a étudié la mono colonisation par différents micro-organismes humains associés aux MICI, dont *Ruminococcus gnavus* et *E. coli* LF82, chez la

souris germ free. Une augmentation des marqueurs inflammatoires est observée chez les animaux mono colonisés par ces pathogènes, mais les résultats ne montrent pas de score lésionnel¹⁴¹. On peut penser que ces mono-colonisations permettent d'enclencher une inflammation mais ne suffisent pas au développement de la pathologie. Le microbiote agit comme un « tout », une unique souche ne peut pas induire la pathologie, il s'agirait plutôt d'un ensemble de micro-organismes, dont les actions assemblées pourraient provoquer la pathogenèse. La colonisation de souris germ free par 7 souches bactériennes humaines et liées aux pathologies inflammatoires intestinales (commensales et pathogènes) a démontré la capacité de ces bactéries à induire une inflammation et des lésions intestinales chez des souris déficientes en IL10, mais pas chez des souris non génétiquement modifiées¹⁴². De plus, l'étude démontre que la composition du microbiote (pourcentage de chaque espèce par rapport au microbiote total) sur les muqueuses des différents compartiments digestifs (iléum, caecum, côlon) est quasiment identique entre les animaux WT et IL10^{-/-}, le changement dans le microbiote n'est donc pas un facteur unique pouvant déclencher la pathologie.

Le microbiote, bien qu'impliqué dans le développement de colite radique, est néanmoins capable d'atténuer les effets néfastes de l'irradiation sur l'intestin. En effet, l'activation de TLR par les composants du microbiote est également un mécanisme d'action impliqué dans la réponse à l'irradiation intestinale. Ces récepteurs sont retrouvés sur différents types cellulaires (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules épithéliales) et peuvent être activés par des éléments bactériens ou viraux. Les TLR2, 6, 4 et 9 peuvent par exemple être activés par une flagelline¹⁴³, un LPS¹⁴⁴ ou un lipopeptide bactérien¹⁴⁵, ou un ADN CpG (cytidine-phosphate-guanosine) viral¹⁴⁶. Des études ont démontré qu'une activation de ces TLR est associée à une diminution des atteintes radio-induites intestinales^{147,148}.

Il apparaît clairement que la pathogenèse de la PRD est un mécanisme complexe, impliquant de nombreux facteurs interconnectés, pouvant s'influencer les uns les autres. Cependant, la définition des facteurs impliqués ouvre la voie à de nouvelles recherches, permettant une meilleure compréhension de la maladie et par la suite, à de meilleurs traitements.

3. Adéquation des modèles animaux dans l'étude de la dysbiose humaine

Les études pré-cliniques donnent des pistes sur les mécanismes impliqués dans l'initiation des pathologies, cependant, certains biais persistent et limitent l'interprétation des résultats obtenus en pré-cliniques aux situations cliniques. Les animaux utilisés dans les études sont généralement homogènes génétiquement, tandis que les humains ont une génétique

diversifiée. Les conditions d'hébergement des modèles posent également problème, leur nourriture est monotone (pas de régime varié), leur environnement est restreint et contrôlé (pas d'exposition à des facteurs extérieurs comme le tabac, la pollution...) et ils partagent généralement leur cage avec d'autres congénères (échange de microbiote, notamment par la coprophagie).

Aux biais associés à la génétique et à l'environnement des modèles animaux s'ajoute la différence entre leur microbiote et celui de l'Homme. Les souris et les rats sont les modèles les plus fréquemment utilisés en pré-cliniques, du fait de leur similarité physiologique avec l'humain, notamment l'anatomie tissulaire et cellulaire du tractus gastro-intestinal (même si quelques différences existent malgré tout, comme la taille du caecum ou la longueur du côlon). La plupart des études utilisent la souris plutôt que le rat, elle est de plus petite taille donc son hébergement est plus économique et elle permet une manipulation génétique grâce à de multiples souches génétiquement modifiées. Cependant le microbiote du rat, plus précisément celui du Sprague Dawley, démontre une similitude avec le microbiote humain, et serait donc plus adéquat en tant que modèle plutôt que la souris (figure 26). Premièrement lors d'une humanisation d'une souris germ free avec un microbiote humain, le microbiote résultant est un microbiote hybride, ni humain, ni souris, le microbiote humain ne s'implantant pas totalement¹⁴⁹. Alors que l'humanisation par le microbiote chez le rat permet un meilleur maintien, dans sa composition et dans le temps, du microbiote humain par rapport à la souris¹⁵⁰. Deuxièmement, une étude a démontré que le microbiote chez le rat adulte, durant sa première année de vie est plus similaire au microbiote humain, en termes d'abondance et de composition, par rapport au microbiote de la souris¹⁵⁰. Certains membres importants du microbiote humain sont retrouvés en abondance similaire chez le rat, notamment *Clostridium* cluster XI, *Akkermansia* et *Lachnospiraceae*, mais pas chez la souris. Cependant, d'autres types bactériens humains sont absents (*Bifidobacterium*, *Ruminococcus*...) ou en faible quantité chez le rat (*Blautia*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*...).

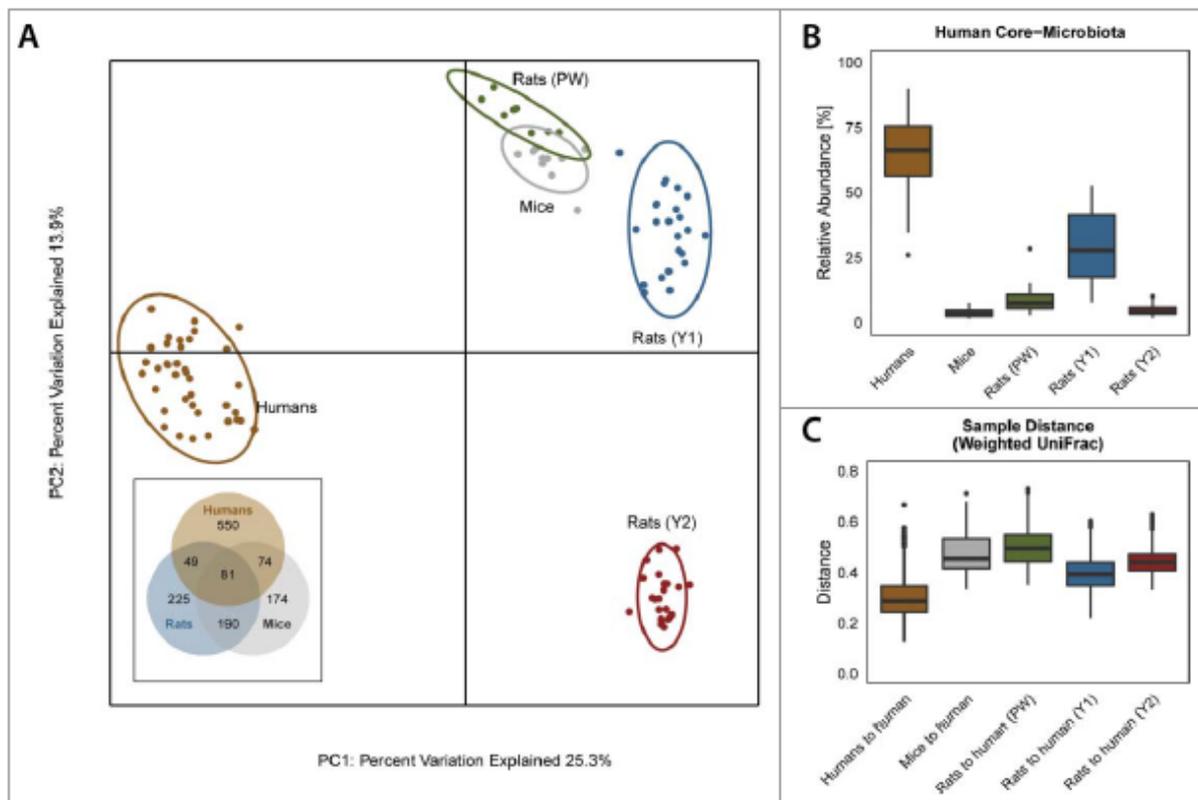


Figure 26 : Hypothèse d'une similarité plus proche du microbiote des humains et de celui du rat¹⁵⁰ ; Les microbiotes de rats et des souris entre eux sont plus proches qu'avec le microbiote humain (A), cependant l'abondance relative des OTU bactériens composant le « noyau » du microbiote humain (OTU présents chez au moins 80% des individus humains) est plus forte chez les rats de 1 an (Y1) que chez les souris, les rats avant leur sevrage (PW ; Prior to weaning) et les rats de 2 ans (Y2) (B). Cette observation est appuyée par l'analyse de la distance moyenne UniFrac, où le microbiote des rats de 1 an montre la plus faible distance par rapport au microbiote humain (C), même si l'analyse du diagramme de Venn (A, diagramme en bas à gauche) montre que les rats et les humains partagent moins d'OTU (49) que les souris et les humains (74).

4. Hypothèses sur la cause de cette dysbiose

Le mécanisme par lequel la dysbiose s'installe après irradiation pelvienne est encore inconnu. Cependant, plusieurs hypothèses s'appuient sur différents phénomènes se déroulant durant la pathogenèse, notamment la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) responsables du stress oxydant. Une autre hypothèse serait que l'apport en oxygène dans le côlon et le rectum pourrait également induire la disparition d'espèces bactériennes sensibles à l'oxygène, dont le phylum des Firmicutes est composé en grande majorité.

La radiolyse des molécules d'eau par les rayons ionisants induit la production d'ERO lors de la radiothérapie. Les neutrophiles, suite au déclenchement de l'inflammation, sont également capables de produire des ERO. Le stress oxydant qui résulte de la production de ces composants crée un environnement favorable à la croissance du phylum Proteobacteria¹⁵¹ et pourrait être néfaste pour les populations anaérobies strictes, dont est composé le phylum Firmicutes. De plus, les ERO sont capables de réagir avec des composés sulfurés luminaux,

induisant la production de composés consommés par *Salmonella enterica*, une bactérie pathogène aérobie, permettant alors sa croissance dans le microbiote¹⁵². Une étude pré-clinique a démontré que l'eau hydrogénée (H₂ dissout dans l'eau) permet de diminuer la toxicité intestinale radio-induite après irradiation abdominale à 15Gy et d'augmenter la survie des animaux¹⁵³. Hypothétiquement, il est possible que l'effet anti-oxydant de l'eau hydrogénée inhibe les ERO, bloquant alors le développement de la dysbiose et diminuant les effets de l'irradiation sur l'intestin induits par la dysbiose¹⁵³. De plus, une diminution des Enterobacteria et des Proteobacteria dans le microbiote est observée suite à l'administration d'eau hydrogénée.

L'apport en oxygène dans le côlon pourrait provoquer une dysbiose par la perte des bactéries sensibles à l'oxygène, phénomène que l'on pourrait nommer « dysanaérobiose ». En effet, cette hypothèse s'appuie sur le constat que la colite radique est liée à une perte de la diversité du microbiote, une diminution des bactéries anaérobies strictes (comme la *Faecalibacterium prausnitzii*) et une augmentation des bactéries anaérobies facultatives et aérobies. Ainsi, l'augmentation de l'oxygène induirait une sélection écologique favorable pour les micro-organismes anaérobies facultatifs et aérobies, leur permettant d'être plus compétitifs et de croître, tandis que les anaérobies stricts seraient affaiblis par l'oxygène et seraient désavantagés. Une étude récente a démontré que le traitement par antibiotiques chez la souris induit la perte des bactéries productrices de butyrate, corrélée à une diminution de la consommation d'oxygène par les colonocytes, augmentant ainsi la concentration en oxygène dans l'environnement luminal¹⁵⁴. L'entrée de sang dans le tractus colorectal, phénomène souvent observé lors d'une inflammation chronique, pourrait également permettre l'augmentation d'oxygène dans l'environnement luminal, notamment par l'hémoglobine relâchée portant de l'oxygène.

III. Agir sur le microbiote pour traiter la PRD

La découverte de l'implication du microbiote intestinale dans le développement de colite radique a ouvert la voie vers une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour traiter cette pathologie : La manipulation du microbiote intestinale pour rétablir l'homéostasie après irradiation ou la prévention de la dysbiose avant radiothérapie. L'utilisation de la transplantation de matière fécale ou de probiotiques sont deux techniques couramment étudiées dans les études récentes. La transplantation fécale n'est qu'aux prémices de son

étude dans le cas de la PRD, tandis que les probiotiques ont montré des effets thérapeutiques efficaces.

A. Transplantation fécale

1. Définition de la transplantation fécale

La transplantation de matière fécale (ou TMF) est une technique médicale consistant à implanter les micro-organismes issus de la matière fécale d'un donneur sain vers un individu malade dont le microbiote a été altéré, dans le but de rétablir un microbiote sain (figure 27). Une fois le don de selles récupéré, il est filtré, mis en suspension et congelé, afin de maintenir une hygiène et une qualité du don, mais également pour une meilleure disponibilité, grâce à la possibilité de stockage. Trois types d'administration sont possibles : Par lavement, lors d'une coloscopie ou par voie haute (sonde nasogastrique ou nasoduodénale), les administrations par voie basse ayant montré une meilleure efficacité thérapeutique¹⁵⁵. Des capsules congelées pour prise orale ont également été récemment développées.

Le premier essai clinique contrôlé sur l'utilisation de la TMF a été effectué en 2013, pour traiter l'infection au pathogène *C. difficile*. Cette étude a été un réel succès, avec 80 à 90% de rémission chez les patients traités par TMF par rapport aux patients traités par antibiotiques seuls¹⁵⁶. Actuellement, l'unique utilisation clinique de la TMF est dans le cadre d'un traitement contre l'infection à *C. difficile* récidivante (réapparition des symptômes infectieux après l'arrêt du traitement), plus précisément après la seconde récurrence, d'après les recommandations de l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) en 2014^{157,158}. Cependant, les études cliniques et pré-cliniques sur l'utilisation de la TMF dans le cadre d'un traitement pour les MICI se multiplient, tandis que l'intérêt de la TMF pour traiter la colite radique se développe lentement.

a. Utilisation de la transplantation fécale en clinique

Un essai thérapeutique a été effectué en juin 2018 en Allemagne¹⁵⁹. La patiente âgée de 56 ans, présente une colite radio-induite chronique, associée à une sténose du côlon sigmoïde. Elle souffre de diarrhée depuis 17 ans, impactant fortement sa qualité de vie. Plusieurs traitements ont été essayés : probiotiques, anti-diarrhéiques, anti-inflammatoires, produits naturels (psyllium, terre curative...), sans succès thérapeutique. L'étude de son cas a mené I. Harsch et P. Konturek à accepter de lui prodiguer une TMF, par administration coloscopique jusqu'à l'iléum. Deux jours plus tard, la patiente s'est présentée aux urgences suite à des

nausées et un gonflement abdominal, sans défécation ni gaz. Le scanner ne montrant rien, les médecins décident de pratiquer une opération chirurgicale et découvrent une strangulation intestinale au niveau de l'iléum, due à une adhésion tissulaire. L'adhésion opérée, la patiente voit ses symptômes intestinaux s'améliorer pendant 3 à 4 semaines, puis revenir à l'état initial avant la TMF. Les médecins soupçonnent la TMF d'être responsable de cette adhésion, bien qu'aucune preuve ne puisse confirmer leur hypothèse.

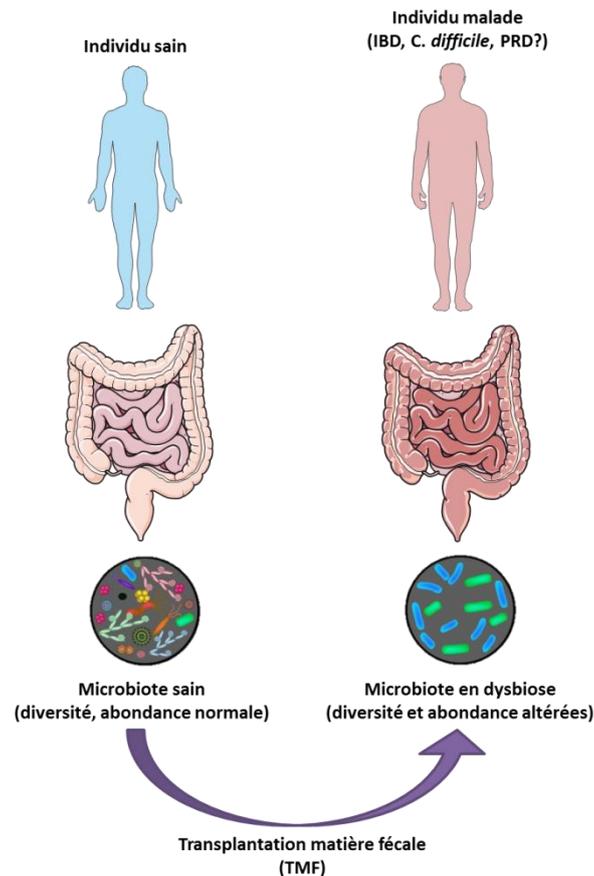


Figure 27 : Principe de la transplantation fécale

Un essai clinique chinois sur l'efficacité thérapeutique de la TMF dans le traitement de l'entérite radique est actuellement en cours, depuis janvier 2018. Cette étude comportera une trentaine de participants atteints d'entérite radique après radiothérapie, qui recevront tous les jours pendant 3 jours, une administration de suspension fécale par voie nasointestinale (clinicaltrials.gov ; mots clés : « radiation enteritis » « fecal transplantation »).

b. Utilisation de la transplantation fécale en pré-clinique

Une unique étude a analysé l'effet d'une transplantation fécale chez des souris irradiées en corps entier à 6,5Gy. L'équipe de Cui et al. a démontré que la TMF de souris saine vers une souris receveuse du même sexe, ayant été exposée à une irradiation corps entier, permet une augmentation de la survie ainsi qu'une amélioration de l'intégrité épithéliale et des fonctions intestinales¹⁶⁰. La TMF par gavage est administrée à partir du jour même de l'irradiation puis est poursuivie quotidiennement jusqu'à 10 jours après l'irradiation. Les souris transplantées conservent une composition microbienne relativement stable durant les 10 jours, démontrant que la dysbiose radio-induite peut être manipulée par la TMF. De plus, la TMF a prouvé ne pas avoir d'effet prolifératif sur les cellules cancéreuses *in vivo*, garantissant une sécurité du traitement. Un plus grand nombre d'études pré-cliniques sur l'effet de la transplantation fécale après irradiation intestinale est cependant nécessaire afin de confirmer les résultats obtenus.

L'utilisation de la TMF dans le cadre d'un traitement de la colite radique a besoin d'être plus amplement étudiée. En effet, bien qu'une étude pré-clinique après irradiation et que des essais cliniques contre l'infection à *C. difficile* ou pour traiter la rectocolite hémorragique aient démontré l'intérêt thérapeutique de la TMF, il ne faut pas ignorer les potentiels risques que peut entraîner une telle opération (effets secondaires, contamination...). Cette technique, bien que prometteuse, doit être plus amplement étudiée pour son application à d'autres pathologies que les infections par des souches bactériennes multi-résistantes, afin d'en améliorer l'efficacité et le contrôle des risques.

B. Probiotiques

1. Définition d'un probiotique

Un probiotique est défini comme un micro-organisme vivant capable d'apporter un bénéfice pour la santé de l'hôte au-delà des effets nutritionnels lorsqu'il est administré en quantité adéquate¹⁶¹. La majorité des probiotiques utilisés à l'heure actuelle en médecine sont d'origine bactérienne et sont généralement des lactobacilles ou des bifidobactéries. Aux probiotiques peuvent également être ajoutés un ou des prébiotiques, c'est-à-dire des substrats nutritifs pour les probiotiques administrés ou pour les bactéries commensales du microbiote, permettant leur survie et leur croissance. Enfin, un symbiotique représente l'association d'un probiotique et de prébiotique, afin d'améliorer l'efficacité de la bactérie. Plusieurs études cliniques et pré-cliniques ont démontré l'efficacité thérapeutique de

l'utilisation de probiotiques pour traiter les symptômes intestinaux liés à la radiothérapie pelvienne.

2. Utilisation de probiotiques en clinique

La première étude clinique sur l'utilisation de probiotique pour prévenir l'apparition de colite radique a été effectuée en 1988. Depuis lors, plusieurs études ont testé différentes souches bactériennes pour gérer les effets secondaires de la radiothérapie abdomino-pelvienne et prouvé que ce type de traitement possède un réel potentiel thérapeutique (tableau 9). Les effets des différentes souches sont généralement observés sur l'incidence et la sévérité des diarrhées des patients (sauf *L. casei* DN-144 001 ; Giralt et al. 2008). Une amélioration des mouvements intestinaux, de la consistance des fèces, du confort intestinal et une diminution des douleurs abdominales sont également observées. Plus important encore, aucune de ces études n'a relevé d'effets secondaires du traitement par probiotiques. Cette observation appuie l'intérêt de ce type de traitement dans le cadre de prévention de la toxicité intestinale radio-induite. D'autres études cliniques démontrent également l'efficacité de prébiotiques dans le traitement d'entérite radique^{162,163}.

| Année/Auteurs | Probiotique/ Prébiotique | Patients | Administration (dose, période) | Résultats |
|----------------------------|---|---|--|--|
| 1988 Salminen E. et al | <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDO 1748 | n=24 Tumeur gynécologique 80Gy | - Boisson (2x10 ⁹ CFU) avec lactulose (prébiotique) - Tous les jours, début=5 jours avant RT ; fin=10 jours après fin de la RT | Diminution des diarrhées |
| 2001 Urbancsek H. et al | Antibiophilus® <i>Lactobacillus ramosus</i> LCR35 | n=206 Tumeur pelvienne et du bas de l'abdomen 50Gy | - Capsule orale (1,5x10 ⁹ CFU) avec lactulose (prébiotique) - Prise en cas de diarrhée pendant une semaine | - Amélioration consistance fèces - Diminution des mouvements intestinaux |
| 2002 Delia P. et al | VSL#3® (<i>S. thermophilus</i> BTO1, <i>B. breve</i> BB02, <i>B. longum</i> BL03, <i>B. infantis</i> BI04, <i>L. acidophilus</i> BA05, <i>L. plantarum</i> BP06, <i>L. paracasei</i> BP07, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> BD08) | n=190 Tumeur pelvienne 60-70Gy | - Un sachet de VSL#3 (450x10 ⁹ CFU/g) - 3 fois par jour, début=1 ^{er} jour de RT ; fin=dernier jour de RT | - Diminution nombre de patients souffrant de toxicité intestinale - Diminution de la sévérité de la toxicité intestinale observée |
| 2007 Delia P. et al | VSL#3® (Voir composition Delia P. et al 2002) | n=239 RT post-opérative de tumeur cervicale, côlon sigmoïde ou rectum 60-70Gy | - Un sachet de VSL#3 (450x10 ⁹ CFU/g) - 3 fois par jour, début=1 ^{er} jour de RT ; fin=dernier jour de RT | - Diminution des mouvements intestinaux - Tendance à diminuer la sévérité des diarrhées (+ diminution usage d'anti-diarrhéiques) |
| 2007 Österlund P. et al | Gefiluss® <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103) | n=85 Tumeur colorectale 45-50Gy + Cisplatine | - Capsule de gélatine (1-2x10 ¹⁰ CFU) 2 fois par jour, tous les jours, à partir du 1 ^{er} jour de thérapie + Gomme de guar tous les jours pendant la 2 ^e semaine de traitement | - Diminution sévérité des diarrhées - Amélioration confort intestinal - Diminution fièvre liée à la chimiothérapie |

Tableau 9 : Utilisation clinique de probiotiques dans le cadre de lésions colorectales induites par radiothérapie pelvienne¹⁶⁴⁻¹⁷³

| Année/Auteurs | Probiotique/ Prébiotique | Patients | Administration (dose, période) | Résultats |
|----------------------------------|--|---|--|--|
| 2008 Giralt J. et al | <i>L. casei</i> DN-114 001 | n=24 Tumeur gynécologique 80Gy | - Yaourt liquide (10 ⁸ CFU/g) - 3 fois par jour, tous les jours, début=une semaine avant RT fin=dernier jour de RT | - Amélioration consistance fèces - Pas d'amélioration de sévérité de diarrhée, ni usage d'anti- diarrhéiques |
| 2010 Chitapanarux I. et al | Infloran® (<i>L. acidophilus</i> et <i>B. bifidum</i>) | n=63 Tumeur cervicale avancée 50Gy + Brachythérapie de 4x7Gy + Cisplatine | - 2 capsules, une pour chaque souche (2x10 ⁹ CFU par capsule) - 2 fois par jour, tous les jours , début=une semaine avant RT fin=dernier jour de RT | - Diminution sévérité des diarrhées (+ diminution usage d'anti- diarrhéiques) - Amélioration consistance fèces |
| 2010 Timko J. et al | "5" Strain Dophilus® (<i>L. rhamnosus</i> HA-111, <i>B.</i> <i>Breve</i> HA-129, <i>L.</i> <i>acidophilus</i> HA- 122, <i>B. longum</i> HA-135, <i>L. Casei</i> HA-108) | n=42 Tumeur abdomino- pelvienne ; RT post- opérative ou chimio-RT 50-67Gy | - Capsule orale (6x10 ¹² CFU) - 2 fois par jour, tous les jours, début=1 ^{er} jour de RT ; fin=dernier jour de RT | - Diminution des diarrhées - Diminution sévérité des diarrhées |
| 2014 Demers M. et al | Bifilact® (<i>L. acidophilus</i> LAC-361 et <i>B.</i> <i>longum</i> BB-536) | n=242 Tumeur endométriale, cervicale, prostatique ou rectale Avec ou sans chirurgie/chimio | - Capsule orale (1,3x10 ¹² CFU) - 2 fois par jour, tous les jours, début=1 ^{er} jour de RT ; fin=dernier jour de RT | - Diminution sévérité des diarrhées |
| 2019 Linn YH et al | <i>L. acidophilus</i> LA-5 et <i>B.</i> <i>animalis subsp.</i> <i>lactis</i> BB-12 | n=54 Tumeur cervicale Avec ou sans chimiothérapie | - Capsule orale (1,75x10 ¹² CFU) - 3 fois par jour, tous les jours, début=1 ^{er} jour de RT ; fin=dernier jour de RT | - Diminution des diarrhées (+ diminution usage d'anti- diarrhéiques) - Diminution sévérité des diarrhées - Diminution douleur abdominale |

Tableau 9 (suite)

3. Utilisation de probiotiques en pré-clinique

| Année/Auteurs | Probiotique/ Prébiotique | Modèle | Administration (dose, période) | Résultats |
|--------------------------|---|---|--|--|
| 2001 Liu Q. et al | <i>L. Plantarum</i> 299v | n=18 Rat Sprague Dawley Irradiation abdomino- pelvienne 10Gy à J3 et J7 | - Gavage oral de 2mL (10 ⁹ CFU/mL) - 2 fois par jour, tous les jours - Début=J0 ; fin=J11 | - Diminution MPO (neutrophiles) - Augmentation collagène |
| 2006 Demirer S. et al | <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> B3 | n=10 Rat Wistar, Irradiation abdomino- pelvienne Dose unique 11Gy | - Gavage oral de 2mL (10 ¹⁰ CFU/mL) - Tous les jours pendant 7 jours - Début=jour de l'IRR ; fin=eutha 7 jours après IRR | - Diminution des diarrhées - Diminution translocation bactérienne dans GM - Diminution de l'inflammation - Accélération processus de réparation |
| 2007 Demirer S. et al | <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> B3 | n=10 Rat Wistar, Irradiation abdomino- pelvienne Dose unique 11Gy | - Gavage oral de 2mL (10 ¹⁰ CFU/mL) - Tous les jours pendant 7 jours - Début=jour de l'IRR ; fin=eutha 7 jours après IRR | - Augmentation activité glutathione-S- transférase dans le jejunum - Possible activité anti-oxydante |
| 2007 Seal MG. et al | Microflorana®-F (<i>L. acidophilus</i> , <i>L.</i> <i>helveticus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp) | n=15 Rat Wistar, Irradiation abdominale Dose unique 20Gy | - Probiotique ajouté à la nourriture - Ajout nouvelle nourriture tous les jours - Début= une semaine avant IRR ; fin=14 jours après IRR, jour de l'eutha | - Augmentation survie - Diminution endotoxines - Diminution contamination bactérienne dans GM et sang |
| 2012 Ciorba MA. et al | <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103 | n=6 Souris C57Bl/6 Irradiation corps entier 12Gy | - Gavage oral (5x10 ⁷ CFU/mL) - Tous les jours pendant 3 jours - Début=3 jours avant IRR ; fin=jour de l'IRR | - Diminution de l'apoptose - Amélioration survie des cryptes - Mécanisme dépendant de TLR2/COX2 : Induction repositionnement des cellules stromales de LP vers la base des cryptes |

Tableau 10 : Utilisation pré-clinique de probiotiques dans le cadre de lésions intestinales et colorectales radio-induites¹⁷⁴⁻¹⁸⁰

| Année/Auteurs | Probiotique/ Prébiotique | Modèle | Administration (dose, période) | Résultats |
|----------------------------------|--|--|---|--|
| 2013 Spyropoulos BG. et al | Prolife® (<i>L. Acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. bifidum</i> and <i>S. Cerevisiae</i>) + Glucosaccharides + Vitamine B | n=15 Rat Wistar Irradiation abdomino- pelvienne Dose unique 1100cGy | - Gavage oral de 2mL ($8,6 \times 10^8$ CFU/mL bactéries + 10mg levure) - Tous les jours, pendant 7 jours - Début=jour de l'IRR ; fin=eutha 7 jours après IRR | - Pas de diminution de l'incidence des diarrhées - Diminution sévérité des diarrhées - Diminution infiltrat des neutrophiles - Amélioration prise de poids - Diminution des lésions - Amélioration de la fonction d'absorption |
| 2014 KI Y. et al | <i>L. acidophilus</i> | n=24 Rat Sprague Dawley Irradiation abdomino- pelvienne Dose unique 10, 15 ou 20Gy | - Gavage oral de 2mL (10^8 CFU/mL) - Tous les jours pendant 10 jours - Début=7 jours avant IRR ; fin=3 jours après IRR (eutha) | - Amélioration morphologie histologique intestin à 10 et 15Gy - Pas d'amélioration sur la taille des villosités à 15Gy - Pas d'effet à 20Gy |

Tableau 10 (suite)

Les études pré-cliniques analysent en grande majorité des souches de type Lactobacillus, une étude intègre également une souche de levure dans son mélange de probiotiques (*S. cerevisiae*) (tableau 10). Les doses administrées et les périodes d'administration varient entre les différentes études, les doses allant de 10^7 à 10^{10} et certaines études commencent l'administration avant l'irradiation tandis que d'autres le jour même de l'irradiation. L'étude de Ciorba *et al.* arrête l'administration après l'irradiation, ce choix de modalité pourrait s'expliquer par le fait que l'ajout de bactéries après la formation de lésions intestinales par l'irradiation n'est peut-être pas propice à la régénération du tissu. Dans l'ensemble, les résultats démontrent une efficacité des probiotiques sur les effets induits par l'irradiation, notamment sur :

- La survie et le poids des animaux
- L'incidence et la sévérité des diarrhées

- L'inflammation et la contamination bactérienne
- La structure de l'épithélium et la fonction intestinale

Certains mécanismes ont été mis en lumière, comme l'action de la *Lactobacillus rhamnosus* GG dépendant de TLR2 et COX2¹⁸¹. Cette bactérie induit le repositionnement des cellules stromales intestinales à la base des cryptes afin d'aider à la réparation du tissu.

Dans une autre étude, *Lactobacillus acidophilus* a démontré un effet bénéfique 3 jours après une irradiation de 10 et 15Gy, mais pas à la dose de 20Gy¹⁸⁰. Cette dose unique d'irradiation est certainement trop forte pour que la bactérie puisse avoir un effet thérapeutique significatif.

Ces études pré-cliniques soulignent l'intérêt thérapeutique des probiotiques pour prévenir des lésions et des symptômes intestinaux liées à l'irradiation pelvienne et révèlent des mécanismes d'action de certaines souches. Agir sur la dysbiose intestinale semble donc une méthode efficace pour traiter les effets secondaires de la radiothérapie pelvienne.

Le microbiote intestinal possède des fonctions cruciales pour le maintien d'une homéostasie stable. Cependant, nous avons vu qu'une altération des populations du microbiote, conséquences survenant par l'action de différents facteurs, est corrélée à l'apparition de pathologies, dont la PRD. L'implication de la dysbiose dans la pathogenèse de la PRD reste encore à être démontrée, néanmoins, l'étude de l'efficacité de traitements probiotiques en clinique et en pré-clinique souligne l'effet thérapeutique de ce type de thérapie. Les souches utilisées jusqu'à aujourd'hui en clinique et pré-clinique sont en grande majorité du genre *Lactobacillus*. Lors des études du microbiote après irradiation pelvienne, ce genre de bactéries n'a pas démontré de diminution significative particulière. Les études de la dysbiose après irradiation pelvienne ont montré la perte d'une bactérie commensale très importante, *Faecalibacterium prausnitzii*. Il existe un fort rationnel à s'intéresser à la réintroduction de bactéries disparues après irradiation pour traiter les symptômes de la radiothérapie afin de ramener les fonctions, importantes pour l'homéostasie intestinale, perdues après irradiation. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a travaillé sur l'effet d'un traitement par *F. prausnitzii* contre les lésions colorectales radio-induites.

CHAPITRE III

***Faecalibacterium prausnitzii*, un
probiotique au fort potentiel
thérapeutique**

I. Caractérisation de la bactérie

A. Caractéristiques, classification et localisation

F. prausnitzii est une bactérie Gram+ non mobile. Sa taxonomie est la suivante :

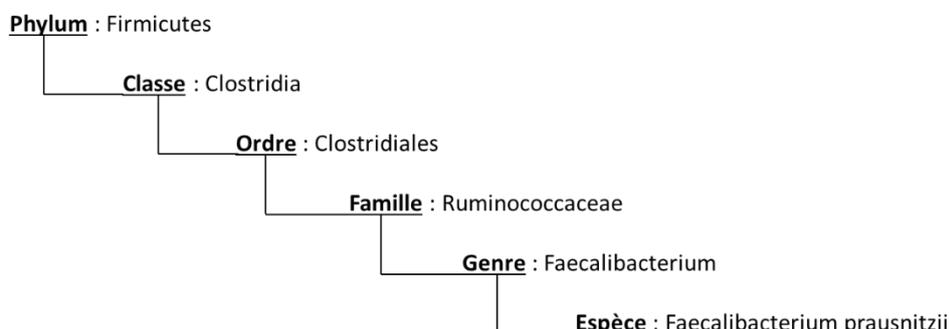


Figure 28 : Arbre phylogénétique de la bactérie *Faecalibacterium prausnitzii*

Cette bactérie fait partie du Clostridium cluster IV, qui regroupe plusieurs genres bactériens de la famille des Ruminococcaceae. *F. prausnitzii* est l'unique espèce à ce jour appartenant au genre *Faecalibacterium*. Sur la base de l'ARNr 16S, deux phylogroupes divisent ces différentes souches, cependant les différences physiologiques entre ces phylogroupes ne sont pas encore connues¹⁸². L'établissement de la taxonomie de *F. prausnitzii* évolue cependant rapidement, puisque des équipes de recherche proposent de nouvelles classifications de cette espèce, notamment la création d'une deuxième espèce *Faecalibacterium moreii*¹⁸³ ou la séparation de *F. prausnitzii* en trois clusters différents¹⁸⁴ (figure 29).

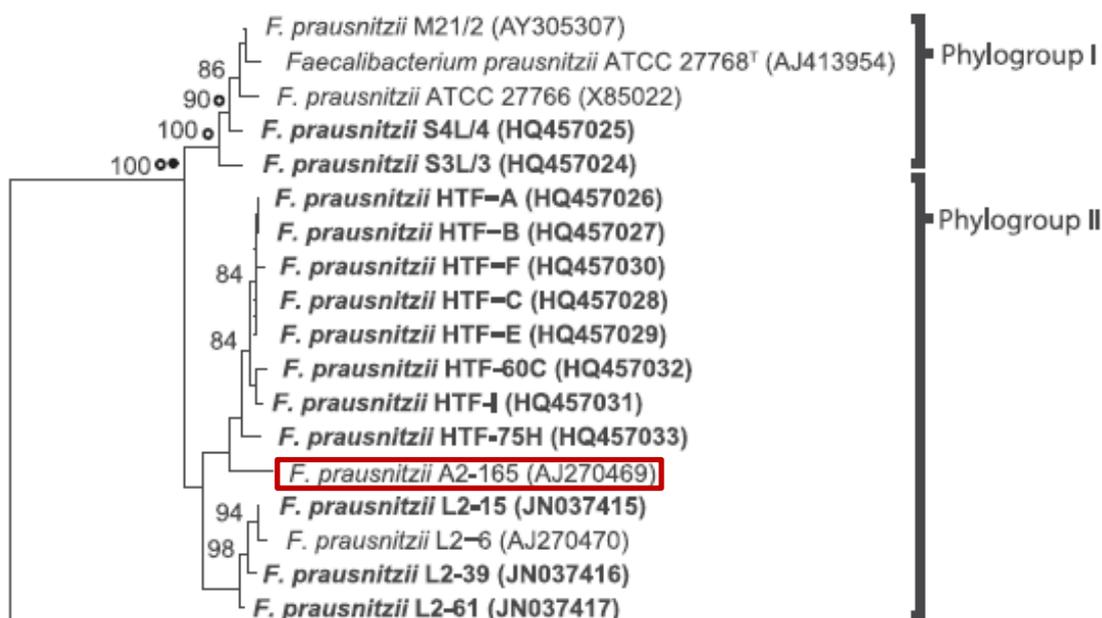


Figure 29 : Une hypothèse de classification des différentes souches connues de *Faecalibacterium prausnitzii*¹⁸²

La souche A2-165 est la souche de référence de cette espèce, c'est l'une des souches les plus utilisées dans les études pré-cliniques et c'est également celle que nous étudions dans ce projet. Elle a une forme de type bacille, mesure environ 2µm et possède des extrémités arrondies. Cette espèce est extrêmement sensible à l'oxygène, la rendant difficile à cultiver, même en conditions anaérobies.

Cette bactérie est retrouvée chez l'humain, majoritairement en forte abondance dans le côlon. Elle représente approximativement 5% du microbiote fécal total chez l'humain sain, certains individus peuvent atteindre jusqu'à 15%¹⁸⁵. D'autres êtres vivants possèdent également *F. prausnitzii* dans leur tractus gastro-intestinal, comme le porc¹⁸⁶, les rongeurs^{150,187}, le veau¹⁸⁸, la volaille¹⁸⁹, la carpe commune¹⁹⁰ et même le cafard¹⁹¹. Cette présence généralisée de *F. prausnitzii* dans les différents organismes souligne son importance dans le microbiote. En effet, cette bactérie remplit de nombreuses fonctions nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale. Il est à noter que la proportion de *F. prausnitzii* varie énormément entre tous ces êtres vivants.

B. Intérêt de *F. prausnitzii* dans le microbiote intestinal

La forte abondance de la *F. prausnitzii* dans le côlon humain indique l'influence que possède cette bactérie sur la santé¹⁹². L'une des fonctions les plus connues de *F. prausnitzii* est sa forte capacité métabolique. Cette bactérie est l'une des plus grandes productrices de butyrate présentes dans le côlon. Le butyrate est un AGCC, dont l'impact sur la santé intestinale a été démontré dans de nombreuses études^{65,193}. D'autres métabolites intéressants sont également sécrétés par *F. prausnitzii*, comme des métabolites anti-inflammatoires ou pouvant jouer un rôle dans le renouvellement cellulaire.

La disparition de *F. prausnitzii* dans le microbiote est corrélée au développement de multiples pathologies : maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)^{194,195}, maladies métaboliques¹⁹⁶ ainsi que le cancer colorectal¹⁹⁷. L'utilisation thérapeutique de cette bactérie comme probiotique a été étudiée dans des modèles pré-cliniques de ces pathologies, particulièrement dans des modèles de MICI. Ces études ont permis d'analyser l'efficacité de *F. prausnitzii* en tant que traitement, mais également de comprendre par quels mécanismes ce probiotique pourrait agir.

II. Utilisation de *F. prausnitzii* dans le traitement des MICI

Plusieurs études pré-cliniques ont été effectuées pour analyser l'effet d'un traitement par la bactérie commensale *F. prausnitzii* afin de déterminer si son utilisation peut être bénéfique pour traiter les patients atteints de MICI. L'administration de *F. prausnitzii* dans des modèles de MICI a permis d'améliorer différentes fonctions altérées dans ces pathologies, telles que la barrière intestinale, les lésions du tissu épithélial et l'inflammation. De plus, certains mécanismes sur sa manière d'influencer ces fonctions ont été révélés.

A. Actions sur diverses fonctions

Dans les études pré-cliniques analysées, deux souches de *F. prausnitzii* sont administrées : ATCC 27766 et A2-165 (tableau 11). La bactérie vivante ainsi que son surnageant sont tous deux testés sur différents paramètres. Ces études ont démontré la capacité de *F. prausnitzii* et de son surnageant à augmenter la survie et à améliorer la prise de poids des animaux chez qui une colite a été induite par le DSS ou le TNBS/DNBS. Ces résultats sur la santé globale des modèles d'inflammation colique sont liés aux effets bénéfiques de *F. prausnitzii* sur les symptômes liés à cette inflammation.

1. Maintien du tissu

De manière générale, les différents articles décrivent une amélioration du score lésionnel du côlon après analyse histologique par coloration. Sokol *et al.* ont démontré une capacité de *F. prausnitzii* A2-165 vivante et de son surnageant à diminuer les scores lésionnels selon les critères de Wallace (épaississement pari colique, ulcération) et Ameho (infiltrat inflammatoire, œdème et nécrose du tissu)¹⁹⁸. La bactérie tuée par UV n'a pas d'effet bénéfique sur ces paramètres.

Les équipes de Zhang et Zhou ont décrit une diminution du score lésionnel, notamment une baisse de l'infiltration de neutrophiles dans le tissu colique après administration de *F. prausnitzii* ATCC 27766 ou de son surnageant^{199,200}. Leur analyse se base sur les critères de Neurath, classifiant de 0 à 4 les tissus coliques en étudiant plusieurs paramètres : l'infiltrat leucocytaire, la densité vasculaire, l'épaisseur de la paroi du côlon et la perte des cellules à mucus. De son côté, l'équipe de Qiu a observé une amélioration prononcée de l'architecture intestinale grâce au traitement par *F. prausnitzii* ATCC 27766 ou par son surnageant²⁰¹.

Martín *et al.* dans leur article de 2014, constatent l'effet bénéfique de l'administration de *F. prausnitzii* A2-165 ou de son surnageant sur la structure colique après induction d'une colite

au DNBS²⁰². Ces deux traitements induisent une diminution de l'infiltrat de cellules inflammatoires dans le tissu, une plus faible perte de cellules à mucus et moins de dommages structuraux.

L'analyse par Huang *et al.* de l'effet du surnageant de *F. prausnitzii* ATCC 27766 sur les lésions histopathologiques induites par DSS a démontré son efficacité thérapeutique²⁰³. En effet, le surnageant a diminué significativement le score lésionnel, basé sur les critères de Neurath. Trois ans plus tôt (2013), Carlsson *et al.* publiaient des résultats totalement inverses sur un modèle DSS également, la différence étant la souche bactérienne, puisque cette équipe utilise du surnageant de *F. prausnitzii* A2-165²⁰⁴. L'article explique que l'observation du côlon après coloration en HES montre une inflammation due au DSS, mais qui n'est pas améliorée par le surnageant.

Ces divers résultats démontrent la capacité de *F. prausnitzii* à réduire les atteintes intestinales. Cependant, il semble que le modèle expérimental de colite utilisé et la souche administrée puissent influencer les résultats obtenus. L'amélioration de la structure épithéliale est intimement liée au maintien d'une barrière efficace. En effet, *F. prausnitzii*, en diminuant les lésions intestinales, participe à la sauvegarde d'une perméabilité stable.

2. Perméabilité intestinale

Carlsson *et al.* étudient en 2013 l'efficacité du surnageant de *F. prausnitzii* A2-165 sur la perméabilité colique induite par ajout de DSS dans l'eau de boisson²⁰⁴. L'analyse de la perméabilité par méthode de chambre d'Ussing montre une amélioration de la perméabilité au niveau de l'iléum des animaux administrés au DSS par rapport aux animaux contrôles, mais pas sur le côlon. L'effet du surnageant de *F. prausnitzii* est observé par une diminution de la perméabilité sur l'iléum, aucune différence significative n'est observée sur la perméabilité colique après traitement par surnageant. L'analyse par Western Blot des protéines extraites du tissu colique ne montre pas de différence significative de l'expression des protéines de jonctions serrées Claudin-1 et Claudin-2 entre les animaux traités par le surnageant de *F. prausnitzii* et non traités.

En 2014, Laval *et al.* publient un article sur l'effet de *F. prausnitzii* sur l'hyper-perméabilité de la barrière colique²⁰⁵. Plus précisément, cet article compare l'effet de *F. prausnitzii* A2-165 à celui de la *Lactobacillus rhamnosus* sur la perméabilité du tissu colique après instillation rectale au DNBS. *F. prausnitzii* est utilisée ici en tant que témoin positif, en s'appuyant sur les

résultats de Carlsson *et al.* en 2013, même si ces derniers n'étaient pas concluants. Cette équipe décrit une diminution de la perméabilité colique *in vivo* par *F. prausnitzii*. L'étude par RT-qPCR a également démontré une augmentation des protéines de jonctions serrées Claudin-4 et F11r (JAM) dans le tissu colique après administration de *F. prausnitzii* dans les modèles de colites, ce résultat est confirmé par analyse immunohistologique de ces mêmes protéines de jonctions serrées.

Une autre équipe a travaillé sur l'effet de *F. prausnitzii* A2-165 et de son surnageant sur l'hyper-perméabilité induite par inflammation colique au DNBS. Martín *et al.* constatent en 2015 que l'administration de *F. prausnitzii* ou de son surnageant réduit significativement la perméabilité colique, grâce à une analyse *in vivo* par gavage au Dextran-FITC²⁰⁶. Le surnageant ayant démontré une meilleure efficacité *in vivo*, la perméabilité colique a été analysée par la méthode de chambre d'Ussing pour confirmer son effet bénéfique sur la barrière *ex vivo*, les résultats furent concluants. Cet effet est corrélé à l'augmentation de l'expression des protéines de jonctions Claudin-4 et F11r (JAM) par *F. prausnitzii* et son surnageant, observée par RT-qPCR et analyse immunohistologique du tissu colique.

Ces trois articles démontrent la capacité de *F. prausnitzii* et de son surnageant à diminuer la perméabilité intestinale par une augmentation des protéines de jonctions serrées, particulièrement les protéines Claudin-4 et F11r. Cependant, l'article de Carlsson *et al.* présente des résultats faibles sur l'efficacité de *F. prausnitzii* sur la barrière colique. Premièrement, la perméabilité colique n'est pas augmentée dans leur modèle de colite, or c'est une caractéristique reconnue dans cette pathologie. Les travaux de Laval et de Martín utilisent des modèles de colite induite par instillation rectale de DNBS et observent une augmentation significative de la perméabilité colique. Cette méthode d'instillation semble donc être plus appropriée pour l'étude de la perméabilité colique dans un modèle de colite. Deuxièmement, l'analyse de l'expression des jonctions serrées par Western Blot ne permet qu'une étude qualitative. Cette technique apporte un résultat global de la quantité de protéines de jonctions serrées du tissu, qu'elles soient intra ou extracellulaire, au même titre que des analyses de l'expression par technique ELISA ou par RT-qPCR. Des analyses complémentaires de localisation comme l'analyse immunohistologique, permettent de différencier le marquage extra et intracellulaire.

| Année/Auteurs | Souche <i>F. prausnitzii</i> | Modèle | Administration (dose, période) | Résultats |
|--|---|--|---|---|
| 2008 H. Sokol et al. ¹⁹⁸ | <i>F. prausnitzii</i> A2-165 | n=9-10 Souris BALB/c Colitis TNBS | - Gavage (10 ⁹ -10 ¹⁰ CFU ou SN ou MC) - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 5j - Début gavage=J0 ; fin=J5 ; induction TNBS à J5 ; eutha à J7 | - Diminution score lésionnel colique par Fp et SN - Amélioration prise de poids et de la survie par Fp et SN - Augmentation taille du colon Fp et SN - Diminution IL-12 et TNF-α dans colon par Fp et SN - Augmentation IL-10 dans colon par Fp et SN - Tendance de Fp et SN à inverser la dysbiose induite par colitis au TNBS |
| 2013 X. Qiu et al. ²⁰¹ | <i>F. prausnitzii</i> ATCC 27766 | n=10 Rat Sprague Dawley Colitis TNBS | - Gavage (10 ⁸ CFU ou SN ou MC ou PBS) - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 7j - Début gavage=J2 ; fin=J9 ; Induction TNBS à J0 ; eutha à J9 | - Diminution score lésionnel colique par Fp et SN - Amélioration prise de poids par Fp et SN - Augmentation IL-10 et TGFβ dans sérum et diminution IL-12p70 par Fp et SN - Diminution expression ARNm T-bet et GATA3 par SN - Diminution expression RORγt par Fp - Augmentation expression FOXP3 par Fp et SN - Augmentation nombre CD25 ⁺ /FOXP3 ⁺ dans CSP et rate par SN |
| 2013 A.H. Carlsson et al. ²⁰⁴ | Surnageant <i>F. prausnitzii</i> A2-165 | n=8-12 Souris C57Bl/6 Colitis DSS | - Gavage (0,35mL SN ou MC) - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 7j - Début gavage=J3 ; fin=J10 ; Induction DSS à J0 ; eutha à J11 | - Amélioration prise de poids par SN - Pas d'amélioration du score lésionnel - Pas d'augmentation de perméabilité <i>ex vivo</i> du colon par le DSS - Diminution de la perméabilité <i>ex vivo</i> de l'iléum par SN - Pas de diminution de l'expression des protéines de jonctions Claudin-1 et Claudin-2 par le DSS |
| 2014 M. Zhang et al. ¹⁹⁹ | <i>F. prausnitzii</i> ATCC 27766 | n=7-8 Rat Sprague Dawley Colitis TNBS | - Gavage (10 ⁹ CFU ou SN ou PBS) - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 7j - Début gavage=J0 ; fin=J7 ; induction TNBS à J6 ; eutha à J8 | - Amélioration prise de poids par Fp et SN - Diminution score lésionnel colique par Fp et SN - Augmentation IL-10 dans plasma par Fp et SN - Diminution IL-23 dans plasma par SN - Diminution IL-17 dans plasma et colon par SN - Augmentation concentration fécale en AGCC (en majorité du butyrate) par Fp et SN |
| 2014 L. Laval et al. ²⁰⁵ | <i>F. prausnitzii</i> A2-165 | n=16 Souris C57Bl/6 Inflammation n colon par DNBS | - Gavage (10 ⁹ CFU ou PBS) - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 10j - Début gavage=J0 ; fin=J20 ; 1 ^{ère} induction DNBS à J0 ; 2 ^e induction DNBS à J21 ; eutha à J24 | - Diminution de la perméabilité <i>in vivo</i> (Dextran FITC) par Fp - Augmentation expression jonctions serrées F11r et Claudin-4 (RT-PCR et IHC) par Fp - Diminution concentration IFNγ, IL-4 et IL-6 dans colon par Fp |

Tableau 11 : Utilisation préclinique de la *Faecalibacterium prausnitzii* dans le cas des MICI¹⁹⁸⁻²⁰⁶

| Année/Auteurs | Souche <i>F. prausnitzii</i> | Modèle | Administration (dose, période) | Résultats |
|---|---|---|--|---|
| 2014 R. Martín et al. ²⁰² | <i>F. prausnitzii</i> A2-165 | n=16 Souris C57Bl/6 Colitis DNBS Sévère et modéré | - Gavage (10 ⁹ CFU ou SN ou MC ou PBS) Groupe colitis modéré : - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 10j - Début gavage=J14 ; fin=J23 ; 1 ^{ère} induction DNBS à J0, 2 ^e induction à J21 ; eutha à J24 Groupe colitis sévère : - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 7j - Début gavage=J8 ; fin=J14 ; 1 ^{ère} induction DNBS à J0, 2 ^e induction à J12 ; eutha à J15 | - Diminution score lésionnel colique et de l'activité MPO par Fp et SN chez groupes colitis modéré et sévère - Amélioration prise de poids et de la survie par Fp et SN chez groupes colitis modéré et sévère - Diminution IL-12 70p et TNF- α dans côlon par Fp et SN chez groupe colitis sévère - Diminution IL-6 et IFN γ dans côlon par Fp et SN chez groupes colitis modéré et sévère - Diminution IL-12 70p et IFN γ dans sérum par Fp et SN chez groupes colitis modéré et sévère - Diminution IL-6 dans sérum par Fp et SN chez groupe colitis sévère - Augmentation nombre de cellules CD3 ⁺ /CD4 ⁺ , CD3 ⁺ /CD8 ⁺ et CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /Foxp3 ⁺ dans la rate par Fp et SN chez groupes colitis modéré et sévère - Inversion par Fp et SN de la dysbiose induite par colitis sévère |
| 2015 R. Martín et al. ²⁰⁶ | <i>F. prausnitzii</i> A2-165 | n=8 Souris C57Bl/6 Colitis DNBS Faible inflammation | - Gavage (10 ⁹ CFU ou SN ou MC ou PBS) - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 10j - Début gavage=J10 ; fin=J20 ; 1 ^{ère} induction DNBS à J0, 2 ^e induction DNBS à J21 ; eutha à J24 | - Diminution de la perméabilité <i>in vivo</i> (Dextran FITC) par Fp et SN - Diminution de la perméabilité <i>ex vivo</i> (Dextran FITC) par SN (Fp non testé) - Augmentation expression jonctions serrées F1.1r et Claudin-4 (RT-PCR et IHC) par Fp et SN - Diminution IL-6 dans sérum et côlon par Fp et SN - Diminution IL-4 et IFN γ dans côlon par Fp et SN - Diminution IL-22 dans sérum par Fp et SN - Diminution concentration sérotonine dans muqueuse colique et contenu fécal par Fp et SN |
| 2016 X.L. Huang et al. ²⁰³ | Surnageant <i>F. prausnitzii</i> ATCC 27766 | n=8-10 Souris C57Bl/6 Colitis DSS | - Gavage (0,1mL/10g SN ou MC) Groupe prévention : - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 5j - Début gavage=J0 ; fin=J5 ; induction DSS à J5, eutha à J10 Groupe traitement : - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 5j - Début gavage=J5 ; fin=J10 ; induction DSS à J5, eutha à J10 | - Amélioration de prise de poids chez groupes prévention et traitement - Augmentation taille du côlon et amélioration du score lésionnel chez groupes prévention et traitement - Diminution nombre de cellules Th17 dans la rate chez groupes prévention et traitement - Diminution IL-17A dans plasma et côlon chez groupes prévention et traitement - Diminution IL-6 dans plasma et côlon chez groupe traitement - Diminution IL-4 dans plasma chez groupe prévention - Diminution ARNm de ROR γ t dans côlon chez groupes prévention et traitement |
| 2018 L. Zhou et al. ²⁰⁰ | <i>F. prausnitzii</i> ATCC 27766 | n=8 Rat Sprague Dawley Colitis TNBS | - Gavage (10 ⁹ CFU/mL ou SN ou MC ou PBS) - 1 fois/jour, tous les jours, pendant 7j - Début gavage=J2 ; fin=J9 ; Induction TNBS à J0 ; eutha à J9 | - Amélioration prise de poids par Fp et SN - Diminution score lésionnel colique par Fp et SN - Augmentation taille du côlon par SN - Diminution nombre de Th17 dans la rate par SN - Augmentation nombre de Treg dans la rate par Fp et SN - Diminution IL-17A et IL-6 dans plasma et côlon par SN - Augmentation TGF β dans plasma par SN |

Tableau 11 (suite)

3. Inflammation

Plusieurs articles s'intéressent à l'effet de *F. prausnitzii* et de son surnageant sur l'inflammation colique. Le premier aspect que nous allons étudier dans cette partie est l'action de *F. prausnitzii* sur l'expression de cytokines systémiques et coliques. En effet, il a été démontré que *F. prausnitzii* est capable de moduler la sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires retrouvées dans la muqueuse colique et dans le sang (tableau 12).

| | Côlon | | Systémique (sérum ou plasma) | |
|---------------------|---|--------------|-------------------------------|----------------------|
| | Diminution | Augmentation | Diminution | Augmentation |
| Sokol et al (2008) | IL-12 TNF α | IL-10 | - | - |
| Qiu et al (2013) | - | - | IL-12 | TGF β IL-10 |
| Zhang et al (2014) | IL-17 | - | IL-17 IL-23 | IL-10 |
| Laval et al (2014) | TNF α IL-4 IL-6 | - | - | - |
| Martín et al (2014) | TNF α IL-12 IL-6 IFN γ | - | IL-12 IL-6 IFN γ | - |
| Martín et al (2015) | IL-6 IL-4 IFN γ | - | IL-6 IL-22 | - |
| Huang et al (2016) | IL-17 IL-6 | - | IL-17 IL-6 | IL-4 |
| Zhou et al (2018) | IL-17 IL-6 | - | - | TGF β |

Tableau 12 : Modification des cytokines secrétées localement et dans le système sanguin par le traitement avec *Faecalibacterium prausnitzii* et/ou son surnageant

De manière générale, on observe une diminution des cytokines IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, IL-22, IL-23, TNF α et IFN γ , ainsi qu'une augmentation de l'IL-10 et de TGF β dans le côlon et le sang. Ces articles démontrent la diminution des cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation des cytokines anti-inflammatoires après l'administration de *F. prausnitzii* et de son surnageant. Cependant, les actions ambivalentes des cytokines modulées rendent difficiles de conclure sur leur impact dans la pathologie et donc sur l'effet réel de *F. prausnitzii* sur l'inflammation. L'IL-17 est fortement reliée à l'inflammation intestinale, sa présence en forte concentration est

généralement considérée comme un marqueur d'inflammation. Cependant, il a été démontré que cette cytokine est nécessaire au processus de réparation épithéliale⁴³. L'IL-12, de manière similaire, est associée à l'inflammation intestinale, mais est nécessaire pour protéger de la translocation bactérienne et d'infection parasitaire dans la muqueuse intestinale^{207,208}. Enfin, l'IL-4 est augmentée (Laval et al, Martín et al (2015)) et diminuée (Huang et al) dans certains modèles de colite, puis l'administration de *F. prausnitzii* ou de son surnageant inverse les niveaux locaux (côlon) et systémiques de cette cytokine. L'IL-4 est une cytokine immunomodulatoire et anti-inflammatoire impliquée dans la régulation du système immunitaire, elle est importante pour le maintien de l'homéostasie intestinale et sa présence est nécessaire pour contrôler l'apparition de pathologies inflammatoires²⁰⁹.

En conclusion de ces effets de *F. prausnitzii* sur la sécrétion de cytokines, il est difficile de statuer sur les cytokines responsables de l'apparition de pathologies inflammatoires intestinales puisque certaines cytokines sont ambivalentes, bénéfique et néfaste pour la santé. Une des conclusions que nous pouvons retirer de ces études est que l'équilibre entre ces cytokines est important pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. Une cytokine, pro ou anti-inflammatoire, en trop faible ou trop forte quantité, va mener à un déséquilibre dans le système immunitaire, enclenchant une réponse immunitaire inadéquate. De manière générale, on observe que *F. prausnitzii* et son surnageant tendent à rééquilibrer les niveaux de cytokines, en maintenant des quantités similaires à celles retrouvées chez les animaux contrôles.

En parallèle des études sur la sécrétion de cytokines, certains articles ont également analysé les populations de lymphocytes T et l'influence de *F. prausnitzii* et son surnageant sur la différenciation et la régulation de ces cellules.

Dans l'article de Qiu *et al.*, l'administration de *F. prausnitzii* ou de son surnageant induit une diminution de l'induction de Th17, Th1 et Th2. L'augmentation de l'induction de Treg est également observée dans le sang et la rate de rats traités au TNBS et administrés avec *F. prausnitzii* ou son surnageant²⁰¹. Huang *et al.* décrivent une diminution des populations Th17 dans la rate et de l'expression de ROR γ t (marqueur cellulaire de Th17) dans le côlon après administration de surnageant de *F. prausnitzii* chez des souris présentant une colite par DSS²⁰³. Enfin, Zhou *et al.* démontrent une augmentation des Treg et une diminution du nombre de Th17 dans la rate de rats traités au TNBS et administrés avec *F. prausnitzii* ou son surnageant, respectivement²⁰⁰.

Certaines de ces études ont également évalué la capacité de *F. prausnitzii* et de son surnageant à moduler la réponse des cellules mononucléaires sanguines humaines d'individus sains^{198,199,210}. Leurs résultats démontrent un effet immunomodulateur *in vitro* de *F. prausnitzii* et de son surnageant en induisant la production de cytokines anti-inflammatoires.

Enfin, Rossi *et al.* ont publié des résultats intéressants sur l'influence de *F. prausnitzii* sur l'activité sécrétoire des cellules dendritiques²¹¹. En effet, la culture de *F. prausnitzii* avec des cellules dendritiques humaines ou murines induit la sécrétion par les cellules de cytokines comme IL-10, IL-1 β , IL-6, IFN- γ et TNF- α ²¹¹.

Ces nombreux résultats sur la capacité de *F. prausnitzii* et de son surnageant à moduler la réponse immunitaire par la régulation des cytokines et des populations de lymphocytes T et de cellules dendritiques apportent des données supplémentaires sur l'efficacité thérapeutique de cette bactérie, dans les modèles expérimentaux comme chez l'humain. Des réponses sur les mécanismes d'action de *F. prausnitzii* doivent désormais être apportées. Parmi les études analysées, certaines d'entre elles ont reporté une efficacité plus forte du surnageant de *F. prausnitzii* que par la bactérie elle-même, au niveau de l'amélioration de la structure épithéliale, du maintien de la barrière intestinale et de la modulation de l'inflammation. L'une des hypothèses les plus évoquées est la présence de métabolites actifs dans le surnageant, sécrétés par la bactérie durant sa culture.

B. Mécanismes d'action

La découverte récente du potentiel thérapeutique de *F. prausnitzii* dans des modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires intestinales apporte de nouvelles questions sur les voies d'action de cette bactérie. La sécrétion de métabolites est une hypothèse grandement étudiée, voire établie. Cependant, d'autres mécanismes pourraient également exister. La stimulation de TLR ou son influence sur la composition du microbiote pourraient également expliquer son efficacité dans le traitement des MICI.

1. Métabolites actifs

a. Butyrate

F. prausnitzii est connue comme l'une des espèces les plus productrices de butyrate. Les effets bénéfiques du butyrate sur le maintien de l'homéostasie intestinales étant démontrés dans de nombreux articles, l'efficacité thérapeutique de *F. prausnitzii* a, dans un premier temps,

été reliée à sa production en grande quantité dans l'intestin. Ce métabolite possède des propriétés immunomodulatoires²¹², une capacité de modulation du stress oxydant²¹³ et de l'inflammation²¹⁴ ainsi qu'une action sur la barrière intestinale²¹⁵. De plus, le butyrate est une importante source d'énergie pour les cellules épithéliales⁶⁵. Les patients atteints de MICI démontrent une diminution de la quantité fécale totale d'AGCC, notamment du butyrate²¹⁶. L'administration de *F. prausnitzii* permet d'augmenter la quantité de butyrate retrouvée dans le côlon. En effet, Zhang *et al.* ont observé une augmentation de la concentration fécale en AGCC (particulièrement en butyrate) après administration de *F. prausnitzii* chez des souris atteintes de colite induite au TNBS¹⁹⁹.

Le butyrate influence également la production de mucines par les cellules à mucus dans le côlon²¹⁷. Le mucus constituant une barrière protectrice de l'épithélium, la rupture de cette barrière entraîne une inflammation. En effet, il a été démontré dans un modèle de colite au DSS que la couche de mucus disparaît avant même l'apparition de l'inflammation²¹⁸. L'observation de la couche de mucus chez les patients atteints de colite ulcéraire active montre une forte pénétration d'éléments luminaux au travers de cette couche, en comparaison avec le mucus d'individus sains ou en rémission²¹⁹. De plus, la qualité du mucus est différente chez les personnes atteintes de colite, notamment le profil de glycosylation des mucines composant le mucus. Les mucines sont faiblement sulfatées²²⁰, alors qu'il a été démontré que ce type de mucine joue un rôle dans la protection de l'intestin²²¹. Wrzosek *et al.*, décrivent un effet de l'administration de *F. prausnitzii* sur la glycosylation des mucines chez le rat²²². La présence de *F. prausnitzii* induit une augmentation des mucines sulfatées, grâce à sa sécrétion de butyrate. En effet, il a été démontré que le butyrate stimule l'expression de sulfotransférases, enzymes impliquées dans la sulfatation des mucines^{221,223}. L'action du butyrate sécrété par *F. prausnitzii* sur la composition du mucus semble donc être l'un des mécanismes par lequel la barrière colique et la structure épithéliale sont conservées.

Zhou *et al.* ont récemment publié un article décrivant l'un des mécanismes qui permet à *F. prausnitzii* de réguler les populations de lymphocytes Th17 et Treg dans un modèle de colite²⁰⁰. Le butyrate produit par *F. prausnitzii* agirait en inhibant l'activité de l'enzyme déacétylase d'histone 1 (HDAC1) (figure 30). Cette enzyme est fortement exprimée par les lymphocytes T du modèle de colite étudié et est impliquée dans l'inflammation intestinale en modulant la différenciation des lymphocytes T naïfs. L'ajout de butyrate dans le milieu de culture de lymphocytes T naïfs *in vitro* diminue l'expression de récepteur à IL-6 sur les lymphocytes, ce qui induit une diminution de l'expression du marqueur ROR γ t, spécifique des

lymphocytes Th17 et donc une diminution de la différenciation en Th17. De plus, ce mécanisme induit également l'activation de l'acétylation sur le locus FoxP3, augmentant la différenciation en Treg.

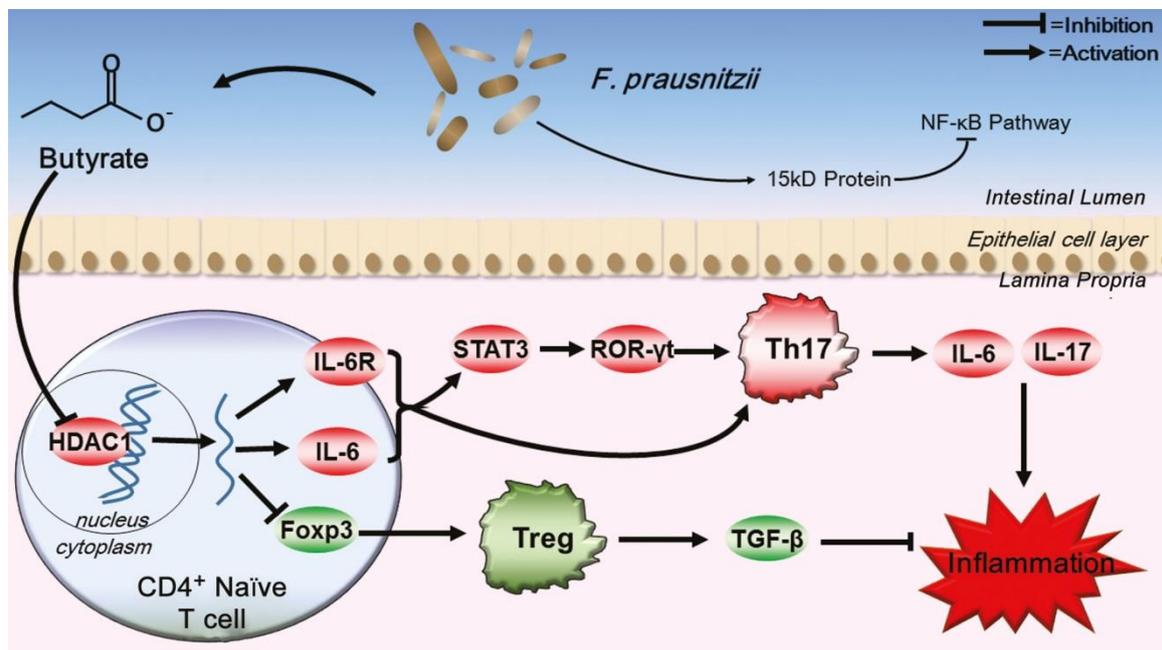


Figure 30 : Inhibition de l'enzyme HDAC1 par le butyrate produit par la *Faecalibacterium prausnitzii* et effets anti-inflammatoires associés²⁰⁰

Les auteurs de cette étude évoquent une autre molécule sécrétée par *F. prausnitzii* et qui seraient également capable de moduler l'inflammation, plus particulièrement en agissant sur la voie NF-κB. Sokol *et al.* suggèrent la même hypothèse, selon laquelle un métabolite de *F. prausnitzii*, autre que le butyrate, lui prodiguerait une capacité anti-inflammatoire par action sur cette voie de signalisation¹⁹⁸.

b. Microbial Anti-inflammatory Molecule (MAM)

L'équipe de Quévrain identifie en 2016 une protéine anti-inflammatoire sécrétée par *F. prausnitzii*¹⁹⁴. Cette protéine de 15kDa, nommée MAM (Microbial Anti-inflammatory Molecule) est capable d'inhiber la voie de signalisation NF-κB. Cette voie de signalisation est impliquée dans le développement de l'inflammation des pathologies inflammatoires intestinales. En effet, sa sur-activation induit une forte réponse inflammatoire, illustrée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1β, IL-6, IL-17 et TNF-α. Quévrain *et al.*, en transfectant des cellules HT29 avec la MAM, ont démontré *in vitro* la capacité de cette molécule à bloquer l'activation de la voie NF-κB. De plus, l'administration *in vivo* dans un modèle murin de colite au TNBS d'une bactérie lactique transfectée avec la MAM induit une diminution des lésions coliques, une augmentation du poids et une diminution des cytokines

IFN γ et IL-17 dans le côlon, en comparaison avec des animaux traités par la bactérie transfectée avec un vecteur vide.

Cette observation *in vivo* a été confirmée grâce aux études de Breyner *et al.* sur l'effet de la MAM dans un modèle de souris transgénique, exprimant la luciférase lorsque la voie NF- κ B est activée²²⁴. L'administration préventive de la bactérie lactique transfectée avec un plasmide contenant le gène codant pour la MAM permet de diminuer l'expression de la luciférase dans ce modèle transgénique de colite au DNBS (figure 31).

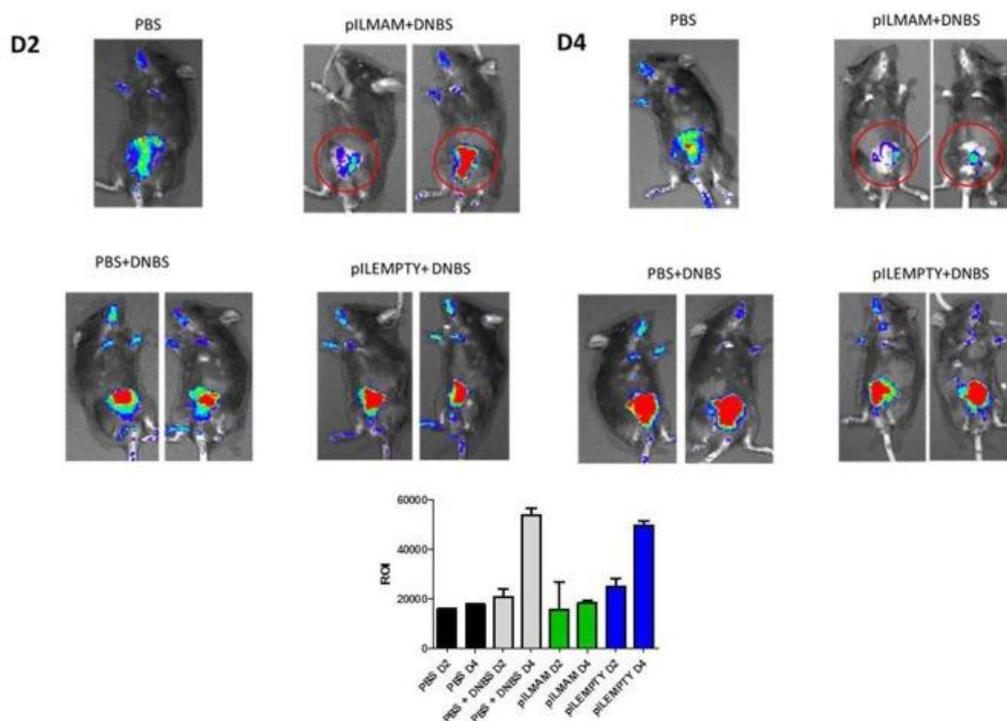


Figure 31 : Observation de la fluorescence induite par luciférase lors de l'activation de la voie NF- κ B et effet anti-inflammatoire de la MAM

La découverte de la MAM apporte un nouvel élément dans la compréhension du mécanisme anti-inflammatoire de *F. prausnitzii*. Cependant, *F. prausnitzii* produit de nombreux autres métabolites pouvant potentiellement agir sur les différents niveaux d'atteintes intestinales.

c. Autres métabolites

L'analyse métabolomique de *F. prausnitzii* a permis d'identifier un panel de molécules sécrétées par cette bactérie dans l'intestin. Miquel *et al.* ont étudié le métabolome colique et fécale durant l'inflammation chez des souris colonisées par *F. prausnitzii* en association avec *E. coli* (puisque *F. prausnitzii* ne peut s'implanter seule dans un modèle axénique) dans une souris germ-free et traitées au TNBS²²⁵. La comparaison du métabolome chez les souris colonisées par *F. prausnitzii* et *E. coli*, et par *E. coli* seule a permis de révéler des métabolites

associés uniquement à la présence de *F. prausnitzii*, parmi lesquels certains pourraient être liés aux effets bénéfiques de cette bactérie :

- Acide salicylique : Ce métabolite a été détecté dans le côlon ainsi que dans le sérum des souris implantées avec *F. prausnitzii*. L'acide salicylique est le précurseur de son dérivé aminé, la molécule 5-ASA (5-aminosalicylique). Le 5-ASA est un traitement anti-inflammatoire couramment utilisé pour soigner les patients atteints de MICI. *In vitro*, l'acide salicylique diminue l'inflammation sur des cellules HT29, en diminuant la production d'IL-8, avec la même efficacité que 20mM de 5-ASA²²⁵.
- Acide shikimique : Egalement détecté dans le côlon et le sérum des souris administrées avec *F. prausnitzii*, l'acide shikimique est un précurseur de certains composants aromatiques, dont l'acide salicylique. Il rentre également dans la voie de synthèse du 5-ASA, cependant il n'a démontré aucun effet anti-inflammatoire sur des cellules HT29 *in vitro*. Il semblerait que l'acide shikimique ait besoin d'être transformé pour produire des métabolites anti-inflammatoires actifs. Un métabolite dérivé de l'acide shikimique, l'ISA (3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid), est capable de protéger contre les lésions coliques par TNBS chez le rat^{226,227}.
- α -cétoglutarate : Retrouvé uniquement dans le sérum des souris traitées par *F. prausnitzii*, l' α -cétoglutarate est impliqué dans le recyclage de l'ammoniaque et disparaît lors d'une dysbiose intestinale²²⁵. Il est décomposé par l'organisme en métabolites actifs, la proline et le glutamate (figure 32). La proline est l'un des précurseurs de l'hydroxyproline, un acide aminé important dans la synthèse du collagène, qui joue un rôle important dans la réparation tissulaire et la cicatrisation. Le glutamate va permettre de synthétiser de la glutamine, un substrat énergétique utilisé par les cellules à division rapide, comme les cellules progénitrices intestinales. Par l'action de ses dérivés, l' α -cétoglutarate participe au maintien de la barrière intestinale.

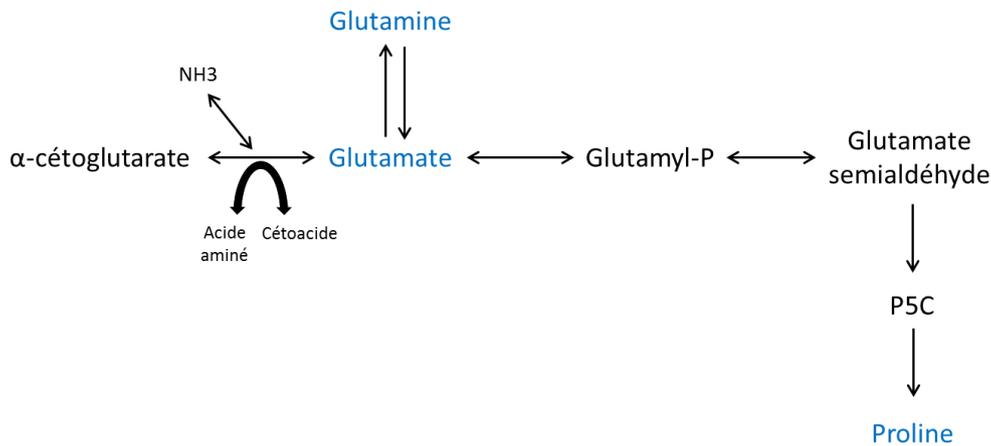


Figure 32 : Décomposition de l'α-cétoglutarate dans l'organisme²²⁸

D'autres métabolites, moins étudiés, sont également retrouvés dans le contenu fécal en présence de *F. prausnitzii*. Parmi eux sont retrouvés le raffinose, impliqué dans le maintien de la perméabilité intestinale²²⁹, ou encore l'acide *trans*-sinapinique, qui est un anti-oxydant^{230,231}.

La forte capacité métabolique de *F. prausnitzii* lui prodigue une action multifactorielle sur les altérations observées dans les pathologies inflammatoires intestinales, notamment la perméabilité et l'inflammation. Cependant, d'autres mécanismes sont également évoqués pour comprendre l'efficacité thérapeutique de cette bactérie, notamment l'activation de TLR ou la modulation du microbiote intestinal.

2. Autres mécanismes d'actions possibles

L'activation des TLR par des bactéries est un processus impliqué dans le maintien de l'homéostasie entre l'activation de l'immunité et la tolérance immunitaire²³². Une étude de Maier *et al.* a permis de mettre en évidence l'activation des TLR2 et TLR2/6 par *F. prausnitzii* A2-165 *in vitro* sur des cellules HEK-293²³³. La mise en place d'une co-culture anaérobie a permis de garder *F. prausnitzii* vivante et de comparer les niveaux d'activation des TLR avec *F. prausnitzii* tuée par UV. Les résultats démontrent une plus forte activation des TLR2 et TLR2/6 par *F. prausnitzii* vivante que morte. Par quel mécanisme *F. prausnitzii* vivante activerait les TLR par rapport à une bactérie morte ? Plusieurs hypothèses sont données par l'équipe : la production de métabolites par *F. prausnitzii* (butyrate, MAM...) qui activeraient de manière directe ou indirecte les TLR, ou la production de PAMP (Pathogen-associated Molecular Pattern) associés à la viabilité (vita-PAMP). Les vita-PAMPs sont produits après la phagocytose de bactéries vivantes, mais pas de bactéries mortes²³⁴. Ce mécanisme est démontré dans le

cas de bactéries pathogènes, néanmoins il est possible que des vita-PAMPs soient exprimés par des bactéries commensales, reconnus par les TLR et puissent jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie.

L'activation du TLR2 dans les cellules épithéliales est associée à un renforcement de la barrière intestinale²³⁵. Il a été démontré que la *Lactobacillus plantarum*, un probiotique ayant un effet thérapeutique contre les pathologies inflammatoires intestinales²³⁶, augmente la formation de jonctions serrées *in vivo* chez des individus sains²³⁷. L'étude *in vitro* de l'effet de cette bactérie sur des cellules Caco-2 a démontré un mécanisme passant par l'activation des TLR2. De plus, une plus forte susceptibilité à la colite induite par DSS est observée dans un modèle de souris déficiente en TLR2⁶⁹. Enfin, l'activation du TLR2/6 induit une immuno-régulation en modulant la différenciation des cellules dendritiques vers un phénotype tolérogène²³⁸.

Deux études sur l'efficacité *in vivo* de *F. prausnitzii* A2-165 dans un modèle de MICI ont démontré une modulation de la dysbiose après l'administration du probiotique. Sokol *et al.* démontrent une tendance de la bactérie à contrebalancer la dysbiose induite par la colite induite au TNBS. La quantité de *F. prausnitzii* est augmentée, tandis que la quantification du groupe C. leptum, C. coccoides et des Bacteroides montre un rééquilibrage des populations par rapport aux animaux traités au TNBS sans *F. prausnitzii*¹⁹⁸. Martín *et al.* observent également un rééquilibrage du microbiote fécal dans leur modèle DNBS après traitement par *F. prausnitzii* A2-165²⁰². L'administration de *F. prausnitzii* induit un retour au niveau contrôle des concentrations fécales en *F. prausnitzii*, Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteroides et *E. coli*.

Ces résultats démontrent une capacité de *F. prausnitzii* à rétablir un microbiote sain dans un contexte d'inflammation colique. Cet effet modulateur peut être associé à la capacité métabolique de *F. prausnitzii*. En effet, le cross-feeding, ou alimentation croisée, est une caractéristique importante dans un microbiote sain. Les bactéries commensales produisent des métabolites pouvant faciliter la croissance d'autres bactéries bénéfiques pour la santé, qui vont elles-mêmes pouvoir produire des molécules actives pour le maintien de l'homéostasie intestinale. *F. prausnitzii* est capable d'interagir avec la *Bifidobacterium adolescentis*²³⁹ et la *Bacteroides thetaiotaomicron*²²² par la voie métabolique pour préserver un épithélium intestinal équilibré. Une étude *in vitro* a démontré les interactions métaboliques existantes entre trois souches commensales fécales humaines : *F. prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* et *Blautia hydrogenotrophica*²⁴⁰.

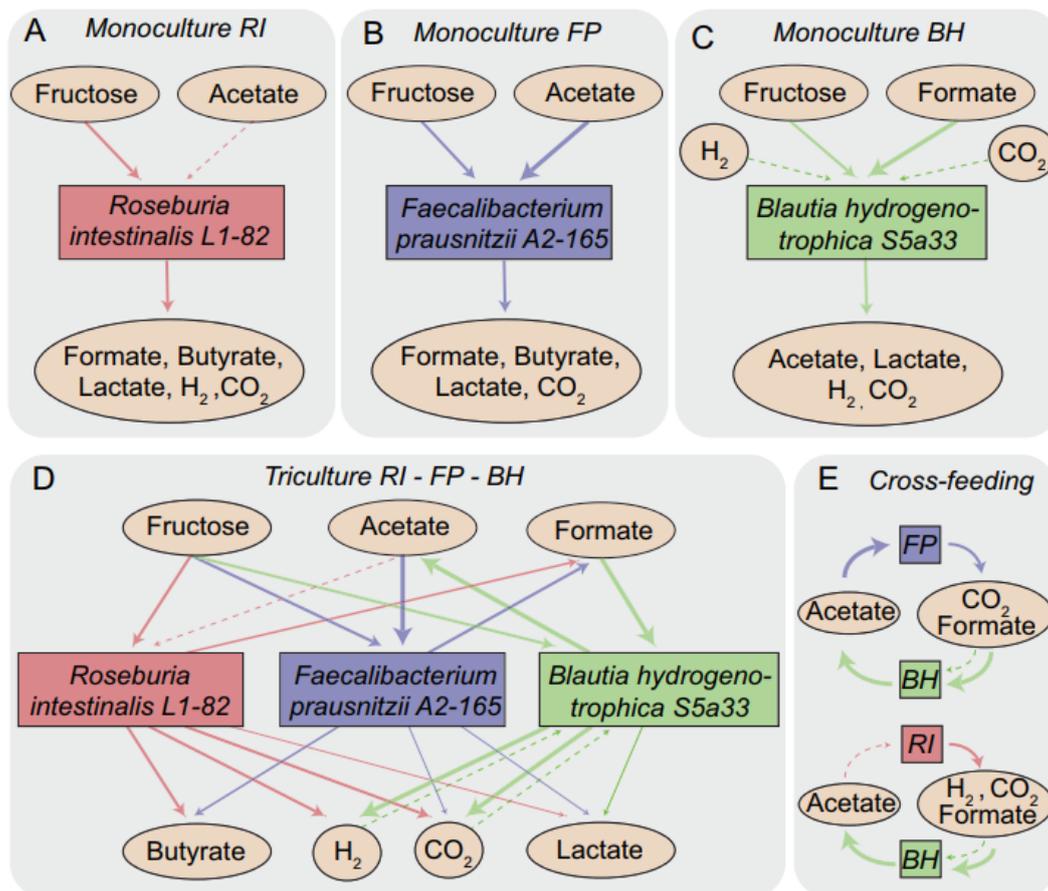


Figure 33 : Schématisation des interactions entre *Faecalibacterium prausnitzii* et d'autres bactéries commensales du microbiote intestinal humain²⁴⁰

L'analyse des molécules sécrétées par chaque espèce seule et en co-culture a mis en lumière les échanges métaboliques effectués entre ces différentes bactéries, appuyant l'importance de la diversité bactérienne dans le microbiote et de la présence de *F. prausnitzii* (figure 33).

L'efficacité thérapeutique de *F. prausnitzii* et la compréhension des mécanismes sous-jacents de cette efficacité dans le cas des pathologies inflammatoires intestinales soulignent le potentiel thérapeutique que pourrait avoir cette bactérie en tant que traitement pour les patients atteints de PRD. Les MICI et la PRD possèdent des caractéristiques pathologiques communes, ainsi l'efficacité de *F. prausnitzii* observée dans les modèles expérimentaux de MICI pourrait être retrouvée dans notre modèle expérimental de lésions colorectales radio-induites.

III. Potentiel thérapeutique de *F. prausnitzii* dans la PRD

Les MICI et la PRD montrent les mêmes types d'altérations intestinales, au niveau de la structure épithéliale, de la perméabilité et de l'inflammation. La comparaison entre ces deux types de pathologies met en évidence la similarité des symptômes observés. L'utilisation de *F. prausnitzii* dans le cadre d'un traitement contre la PRD s'appuie sur ces caractéristiques partagées entre MICI et PRD.

A. Caractéristiques communes entre MICI et PRD

Les modèles expérimentaux utilisés pour étudier l'efficacité thérapeutique de *F. prausnitzii* dans le cadre de MICI sont des rongeurs (rats et souris) administrés au TNBS/DNBS (Trinitrobenzene/Dinitrobenzène Sulfonic) ou au DSS (Dextran Sulfate Sodium)²⁴¹. Les modèles de colite au TNBS/DNBS sont régulièrement utilisés pour étudier la maladie de Crohn, tandis que le modèle DSS est plus proche de la colite ulcéraire/rectocolite hémorragique²⁴². Si les symptômes de ces deux pathologies sont similaires (diarrhées, douleurs abdominales, saignements...), chaque pathologie possède une étiologie différente, bien que peu connue et partiellement établie.

L'administration de DSS, un polysaccharide sulfaté toxique pour l'épithélium colique, induit une inflammation aiguë, associée au développement d'une érosion épithéliale, voire d'un ulcère, d'une perte de cryptes et d'une infiltration de granulocytes dans le tissu. En réponse au DSS, les cellules épithéliales vont produire des radicaux libres, qui vont se diffuser dans l'environnement colique et induire des dommages à l'épithélium²⁴³. Ces dommages épithéliaux, suite à l'arrêt du cycle épithélial (apoptose, altération de la prolifération) conduisent à une altération de la barrière intestinale qui va permettre l'entrée de bactéries luminales dans la muqueuse. La lésion primaire de la colite au DSS est donc l'altération de l'épithélium, suivie d'une réponse immunitaire liée à la rupture de la barrière, qui s'illustre par l'activation de neutrophiles et de macrophages. La réponse immunitaire innée constitue la réponse majoritaire dans ce modèle de colite aiguë, cette observation est confirmée par des études démontrant que des souris déficientes en immunité adaptative développent une colite au DSS²⁴⁴. Les cytokines provenant de l'immunité innée sont, par conséquent, suffisantes au déclenchement de l'inflammation par le DSS. Le modèle DSS est un modèle adéquat pour étudier les mécanismes innés de l'inflammation colique, notamment les rôles joués par les macrophages et les neutrophiles. Cependant, la colite au DSS chronique, obtenue par des

administrations répétitives de DSS à long terme, induit une réponse adaptative par Th1 et Th2, démontrant que la réponse par les lymphocytes T aggrave la réponse inflammatoire²⁴⁵.

Le TNBS/DNBS induit l'hapténisation des protéines coliques, les rendant immunogéniques pour le système immunitaire. Ce mécanisme conduit à une rupture de tolérance et initie une réponse immunitaire mucoale²⁴⁶. La colite obtenue est transmurale (tous les tissus coliques sont atteints), et se caractérise par une réponse immunitaire Th1 et l'infiltration de lymphocytes T CD4+, de neutrophiles et de macrophages dans la lamina propria²⁴⁷. Ces caractéristiques immunitaires sont similaires à celles observées chez les patients atteints de la maladie de Crohn, faisant de ce modèle un choix adéquat pour étudier les aspects immunitaires de cette maladie. La sécrétion de cytokines est un élément clé dans le mécanisme de l'inflammation chez les MICI. La synthèse d'IFN γ par les lymphocytes Th1 est une des caractéristiques de la maladie de Crohn et est supposée comme responsable de l'inflammation²⁴⁸. Dans le modèle de TNBS, une augmentation de la production d'IFN γ est observée, confirmant l'adéquation du modèle expérimental²⁴⁷. La réponse immunitaire adaptative dominante est de type Th1, cependant la réponse Th17 joue également un rôle dans le maintien de l'inflammation, mais également dans sa régulation. Enfin, la colite chronique au TNBS chez la souris BALB/c conduit à la formation d'une fibrose de la lamina propria suite à une augmentation du dépôt de collagène²⁴⁹.

Bien que l'étiologie des pathologies des MICI n'ait pas encore été clairement établie, les différentes altérations observées sont communes avec la PRD. Le modèle DSS, illustré par une réponse immunitaire majoritairement innée, correspond aux atteintes aiguës de l'irradiation de la zone colorectale (radicaux libres, rupture de la barrière, infiltrat de neutrophiles et de macrophages). Tandis que les modèles TNBS/DNBS, conduits par une réponse inflammatoire majoritairement adaptative, correspondent aux atteintes chroniques de l'irradiation colorectale (réponse adaptative, formation de fibrose). Ainsi, l'efficacité thérapeutique de *F. prausnitzii* dans les modèles DSS et TNBS/DNBS suggère que cette bactérie serait également efficace pour traiter les lésions à court et long terme de l'irradiation pelvienne.

B. Actions potentielles de *F. prausnitzii* sur les différents niveaux d'atteintes de la PRD

Les résultats sur l'effet de *F. prausnitzii* dans des modèles expérimentaux de MICI soulignent le potentiel thérapeutique que pourrait avoir ce probiotique dans notre modèle expérimental de lésions colorectales radio-induites. En effet, la capacité de *F. prausnitzii* à diminuer les

altérations épithéliales pourrait permettre de préserver la muqueuse colique à court terme après irradiation et ainsi de maintenir une perméabilité stable. Associée à ces deux altérations, l'inflammation innée par les neutrophiles et les macrophages serait régulée par l'administration de *F. prausnitzii*. Enfin, les caractéristiques inflammatoires chroniques liées à l'irradiation, comme la dérégulation des populations de lymphocytes T, seraient rééquilibrées grâce à l'action immunomodulatoire de *F. prausnitzii*.

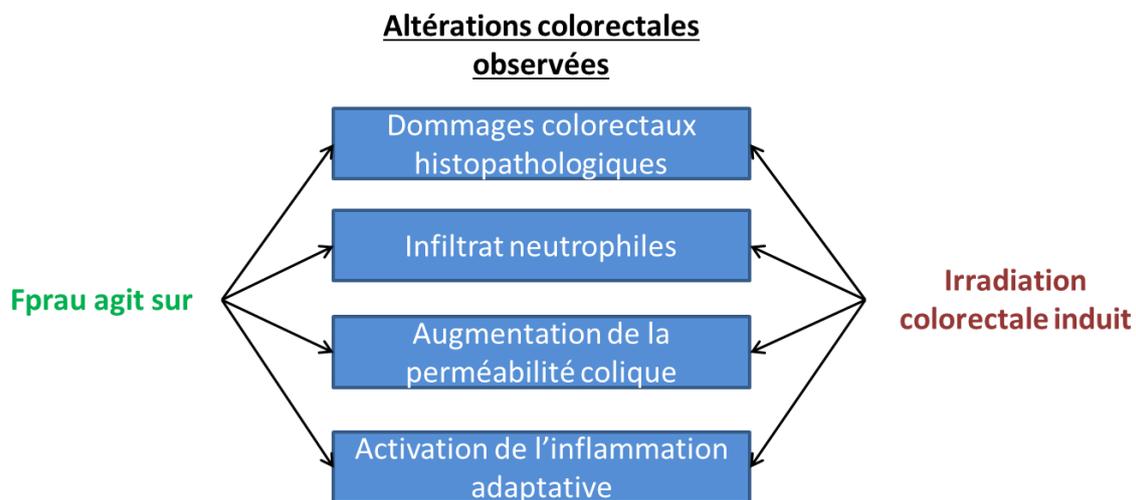


Figure 34 : Représentation schématisée de l'effet potentiel de *F. prausnitzii* sur les altérations colorectales radio-induites

Pour conclure, *F. prausnitzii* est une bactérie possédant un fort potentiel thérapeutique et qui a démontré son efficacité dans le traitement de pathologies inflammatoires intestinales expérimentales. Ses effets sur le maintien de la structure épithéliale, de la perméabilité et sur la régulation de la réponse immunitaire lui confèrent les caractéristiques recherchées pour un traitement contre ce type de pathologie (figure 34). Ses modes d'action, comme sa capacité métabolique, l'activation des TLR et son influence sur les autres bactéries commensales du microbiote, font de cette bactérie un probiotique multifactoriel capable d'agir par différents mécanismes pour multiplier son efficacité thérapeutique. De plus, la disparition de *F. prausnitzii* du microbiote de patients traités par radiothérapie pelvienne est liée à l'apparition de symptômes intestinaux radio-induits, soulignant l'importance de son rôle dans le maintien de l'homéostasie. C'est pourquoi cette bactérie est un excellent candidat à l'étude de l'effet d'un traitement par probiotique pour prévenir l'apparition de lésions colorectales radio-induites.

Problématique et objectifs de la thèse

Rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir de l'apparition des effets secondaires colorectaux radio-induits est une réelle nécessité. Le microbiote intestinal est un élément important dans le développement des effets secondaires, notamment dans le cas par l'apparition d'une dysbiose. Chez les patients traités par radiothérapie pelvienne et présentant des symptômes comme la diarrhée, un changement dans les populations bactériennes a été observé. Cette observation a donné lieu à de nombreuses études cliniques et pré-cliniques de l'effet de l'administration de probiotiques pour traiter les atteintes intestinales et coliques radio-induites. Nouvelle entrante dans la famille des NGP (Next Generation Probiotics), la *Faecalibacterium prausnitzii* est une bactérie importante dans le microbiote colique et qui possède des fonctions essentielles pour la santé humaine. La diminution du genre *Faecalibacterium* après radiothérapie pelvienne chez les patients ayant développé des symptômes aigus amène la réflexion de la corrélation entre sa disparition et le développement de ces effets secondaires. Dans des modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires, où la population de cette bactérie est également réduite chez les patients atteints, l'administration de cette bactérie a apporté un bénéfice thérapeutique important. L'intérêt d'administrer la *F. prausnitzii* pour réduire les atteintes colorectales radio-induites se pose désormais. Un traitement permettant de prévenir le développement des atteintes aigues colorectales, qui commencerait avant l'irradiation et continuerait après irradiation, pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. En effet, en maintenant les fonctions de *F. prausnitzii* dans le côlon, le développement des altérations observées après irradiation de la zone colorectale pourrait être empêché.

Le premier objectif de cette thèse consiste à observer quelles sont les améliorations induites par l'administration de *F. prausnitzii* à court terme. Nos études se porteront sur une analyse fonctionnelle *ex vivo* de la perméabilité colique ainsi qu'une analyse *in vivo* de la structure colique, de l'état de renouvellement et des paramètres inflammatoires du tissu colique. Le deuxième objectif est l'étude de la pérennité de l'effet de *F. prausnitzii* sur des atteintes à long terme. La première étape de cet objectif consiste à rechercher quelle modalité d'administration serait la plus optimale pour empêcher le développement des altérations colorectales radio-induites tardives. Nous chercherons également des méthodes efficaces de potentialisation de ce traitement à long terme, ce qui constituera la deuxième étape de cet

objectif. Pour évaluer l'efficacité thérapeutique de l'administration de *F. prausnitzii* sur l'établissement des lésions à long terme, qui représentent les lésions sub-aigües radio-induites, nous mesurerons la taille de la lésion colorectale par analyse histologique.

ARTICLE ET RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Prophylactic *Faecalibacterium prausnitzii* treatment prevents colonic epithelial barrier breakdown in a preclinical model of pelvic radiation disease.

Alexia Lapiere¹, Mallia Geiger¹, Véronique Robert², Christelle Demarquay¹
Sandrine Auger², Mohamedamine Benadjaoud⁴, Gabriel Fernandes³, Fabien
Milliat¹, Philippe Langella², Marc Benderitter⁴, Jean-Marc Chatel², Alexandra
Sémont¹

1. Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of RAdiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of MEDical Radiobiology (LRMed), Fontenay-aux-Roses, 92260, France.

2. Paris-Saclay University, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France Department, University, City, Country,

3. Federal University of Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte, MG, Brazil.

4. Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of RAdiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED) Fontenay-aux-Roses, 92260, France

Corresponding author: Alexandra Sémont (PhD), Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of RAdiobiology and regenerative MEDicine (SERAMED), Laboratory of MEDical Radiobiology (LRMed), Fontenay-aux-Roses, 92260, France, e-mail: alexandra.semont@irsn.fr, address:, phone number: +33 (0) 158359533

Prophylactic *Faecalibacterium prausnitzii* treatment prevents colonic epithelial barrier breakdown in a preclinical model of pelvic radiation disease.

Abstract

Every year, millions of people around the world benefit from radiation therapy to treat cancers localized in the pelvic area. Damage to healthy tissue in the radiation field can cause undesirable toxic effects leading to gastrointestinal complications called pelvic radiation disease. A change in the composition and/or function of the microbiota could contribute to radiation-induced gastrointestinal toxicity. In this study, we tested the prophylactic effect of a new generation of probiotic like *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) on acute radiation-induced colonic lesions. Experiments were carried out in a preclinical model of pelvic radiation disease. Rats were locally irradiated at 29 Gy in the colon resulting in colonic epithelial barrier rupture. Three days before the irradiation and up to 3 days after the irradiation, the *F. prausnitzii* A2-165 strain was administered daily (intragastrically) to test its putative protective effects. Results showed that prophylactic *F. prausnitzii* treatment limits radiation-induced para-epithelial hyperpermeability, as well as the infiltration of neutrophils (MPO⁺ cells) in the colonic mucosa. Moreover, *F. prausnitzii* treatment reduced the severity of the morphological change of crypts, but also preserved the pool of Sox-9⁺ stem/progenitor cells, the proliferating epithelial PCNA⁺ crypt cells and the Dclk1⁺/IL-25⁺ differentiated epithelial tuft cells. The benefit of *F. prausnitzii* was associated with increased production of IL-18 by colonic crypt epithelial cells. So, *F. prausnitzii* treatment protected the epithelial colonic barrier from colorectal irradiation. New-generation probiotics may be promising prophylactic treatments to reduce acute side effects in patients treated with radiation therapy and may improve their quality of life.

Keywords: *Faecalibacterium Prausnitzii*, Prophylactic treatment, Pelvic radiation disease, colonic barrier, inflammation, tuft cells

Introduction

Cancer is the second leading cause of death globally. Radiation therapy, an established part of treatment of both primary and recurrent pelvic malignancies, is used in almost 50% of cases and concerns millions of people worldwide each year. Improvement in treatment in the last decades has led to a threefold increase in the number of cancer survivors over the last 30 years. The efficacy of radiation therapy requires an optimal compromise between tumor control and healthy, normal tissue tolerance; this is referred to as the benefit/risk ratio. Following radiation therapy, healthy tissue around the tumor can be damaged, initiating in 90% of patients acute, and in 5% to 10% of patients, chronic side effects. High incidence of acute symptoms is reported during or shortly after the end of the radiation therapy. In some cases, depending on dose, volume, as well as individual susceptibilities, severe acute symptoms may result in treatment suspension, and thus failure of tumor control. Moreover, more than 10 years after the end of the treatment, patients may exhibit persistent overlapping symptoms (diarrhea, constipation, bloating, pain...), resulting from multiple visceral organ dysfunctions. All these symptoms were recognized in 2010 as a new disease entity called “pelvic radiation disease” (PRD)¹.

Digestive mucosa constitutes a physical barrier, the first line of defense against pathogen infiltration in the organism. Due to the high proliferative capacity of crypt epithelial stem/progenitor cells, colonic mucosa is highly radiosensitive. After local radiation exposure, a complex cascade of biological effects, i.e. from damage of multiple biomolecules to cell phenotype modification and/or death, may induce disruption of barrier integrity. Colonic barrier disruption may drive bacterial translocation and likely the maintenance and/or exacerbation of mucosal inflammation². After local radiation exposure, in the absence of acute immune response control, chronic inflammation could lead to persistent and irreversible damage. So, protecting the colonic mucosa from radiation toxicity and therefore from the progression of inflammation might result in the alleviation of acute and chronic side effects and should improve the patient’s quality of life and/or reduce the risk of life-threatening conditions.

In 2014, Andreyev suggested that intestinal microbiota could be implicated in the initiation and/or maintenance of radiation-induced intestinal toxicity³. In patients receiving pelvic radiation therapy, there is a loss of microbial diversity which is more pronounced in those with side effects like diarrhea. Among observed abundance variation, bacteria belonging to the genus *Faecalibacterium* were reduced^{4,5}. *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) is one of the most abundant anaerobic bacteria in the human colon (up to 5%) and so far the only member of the *Faecalibacterium* genus. Preclinical experiments performed in animal models of inflammatory bowel disease have previously demonstrated the therapeutic benefit of prophylactic treatment with *F. prausnitzii*, which reduces colonic damage and leads to increased survival of animals⁶⁻¹¹. Earlier studies demonstrated an ability of *F. prausnitzii* to reduce histological and functional colonic barrier impairment. The beneficial effects of *F. prausnitzii* were associated with its tendency to counterbalance dysbiosis and with local or systemic anti-inflammatory effects^{6-8,12}. While these studies have outlined a protective effect of *F. prausnitzii* treatment on the colonic mucosa, probably in part via management of the inflammatory response, the overall effect of *F. prausnitzii* on proliferation and self-renewal of crypt epithelial cells remains unknown.

In this study, we made the assumption that *F. prausnitzii* administration might preserve colonic mucosa from radiation damage by controlling the immune response. Our objectives were to test the effectiveness of prophylactic *F. prausnitzii* treatment on radiation-induced colonic mucosal barrier breakdown. We analyzed various parameters to assess the maintenance and/or disruption of colonic mucosal barrier integrity, such as histological structure and self-renewal of the colonic epithelium, para-epithelial permeability, microbiota composition/diversity and the inflammatory process. In a context of radiation-induced colonic mucosal toxicity and dysfunction, we found that prophylactic *F. prausnitzii* treatment had protective effects. We demonstrated that this effect is associated with the ability of *F. prausnitzii* to prevent acute para-epithelial permeability and therefore the non-specific immune response. Our results also suggested for the first time that the therapeutic benefit of *F. prausnitzii* might also follow

activation of protected epithelial cells and underlined the probable involvement of differentiated epithelial cells, principally tuft cells.

Materials and Methods

Ethics statement

All experiments were performed in compliance with the Guide of the Care and Use of Laboratory Animal as published by the French regulations for animal experiments (Ministry of Agriculture Order No. B92-032-01, 2006) and with European Directives (86/609/CEE) and were approved by the local ethics committee of our institute (permit number P16-07).

Animals

Male SD (Sprague Dawley) rats (Janvier SA, Le Genest St Isle, France) weighing 250-300g were housed in standard conditions for a minimum of one week before experimentation. They were allowed free access to water and fed standard pellets.

Bacterial strains and growth conditions

Faecalibacterium prausnitzii strain A2-165 (DSMZ collection, Braunschweig, Germany) (DSM n° 17677) was grown in LYBHI medium (brain-heart infusion medium supplemented with 0.5% yeast extract) (Difco, Detroit, USA) supplemented with 1 mg/mL cellobiose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), 1 mg/mL maltose (Sigma-Aldrich), and 0.5 mg/mL cysteine (Sigma-Aldrich) at 37°C in an anaerobic chamber (90% N₂, 5% CO₂ and 5% H₂). Bacteria were harvested by centrifugation, washed in PBS, re-suspended in PBS containing 20% glycerol and stored at -80°C.

Irradiation protocol and *F. prausnitzii* administration

Rats were anesthetized by isoflurane inhalation and a single 29 Gray (Gy) dose of irradiation was delivered by a medical accelerator (Alphée) through a 2x3cm window centered on the colorectal region. Alphée is an accelerator-type radiation source (maximal energy is 4 MeV with an average energy of about 1.5 MeV; 30kA). Three days before irradiation, 1.10⁹ CFU of bacteria or PBS was administered intragastrically each day, and then daily until sacrifice, three

days after irradiation. The study groups are as follows: Control group (Ctrl PBS): non-irradiated and PBS-treated rats, Irradiated group (IRR PBS): irradiated and PBS-treated rats, and *F. prausnitzii* treated group (IRR Fprau): irradiated and *F. prausnitzii* -treated rats.

Histological and damage analysis

Animals were sacrificed by isoflurane inhalation 3 days after colorectal irradiation. Distal colons were removed, fixed in 4% formaldehyde, cross-sectioned in 4 equal pieces and embedded in paraffin. Paraffin embedded colons were cut on a rotary microtome (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) into serial circular sections of 5 µm, in 5 series spaced by 250 µm and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Each slide was composed of 4 circular sections of the cross-sectioned colon representative of lesion along the colon. The severity of colorectal atypia on each circular section was assessed using a lesion score with Histolab software (Microvision Instruments, Lisses, France). Determination of the injury score was based on crypt morphology, edema and inflammatory infiltration in mucosa. Graduation of the injury was 0=null; 1=slight; 2=moderate. The percentage of sections with low atypia (corresponds to $0 \leq \text{score} \leq 3$) and high atypia (correspond to $3 \leq \text{score} \leq 6$) of each animal group was calculated. Morphometric analysis of crypt depth was also performed on HES-stained slides.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

For immunohistochemistry, sections were deparaffinized and hydrated. Tissue sections were treated with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS 1x (Life Technologies) at room temperature (RT) for 10 min. Then endogenous peroxidases were inhibited by incubation with 3% H₂O₂ in methanol at RT for 10 min. Citrate buffer (10 mM, pH6) (Zytomed) was used as an antigen retrieval solution; incubation lasted 15 min at 350W. After saturation (X0909, Dako), rabbit anti-SOX9 (ab185230, Abcam, 0.803-0.971 mg/mL, for stem/progenitor epithelial cell staining) diluted to 1/2000 and rabbit anti-MPO (IMG-803971, Abcam, for neutrophil staining)

diluted to 1/75 was applied for 16 h at 4°C. After saturation (X0909, Dako), mouse anti-PCNA antibody diluted to 1/10000 (M0879 Dako, 525 µg/mL, for proliferating cell nuclear staining), and mouse anti-CD68 (MCA341R, AbDserotec, for resident macrophage staining) diluted to 1/200 was applied for 1 h at 37°C. Sections were then incubated for 30 min at RT with respectively anti-rabbit-HRP Ig (D13-110, GBI Labs) or anti-mouse-HRP Ig (D55-18, GBI Labs). Staining was developed with HRP Green (ZUC 070-100, Zytomed). Then sections were counterstained with nuclear fast red (H3403, VectorLabs), dehydrated and mounted. The negative control was assessed with rabbit and mouse IgG (Dako, X0931) instead of the analyzed primary antibodies.

For immunofluorescence, sections were deparaffinized and hydrated, incubated with 3% H₂O₂ in methanol followed by an incubation in citrate buffer. After saturation (X0909, Dako), rabbit anti-Dclk1 (ab109029, Abcam, for tuft cell staining) diluted to 1/300 or rabbit IL-25 (ab108530, Abcam) diluted to 1/500 was applied for 16 h at 4°C. After saturation (X0909, Dako), rabbit anti-IL-18 (HPA003980, Atlas antibodies) diluted to 1/50 was applied for 1 h at 37°C. Sections were then incubated with donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (A21206, Invitrogen) diluted to 1/200 for 1 h at RT. Slides were counterstained with DAPI and mounted with Vectashield (H-1000, Vector). The negative control was assessed with rabbit IgG (Dako, X0903) instead of the analyzed primary antibodies.

Ex vivo para-epithelial permeability measurement in Ussing chambers

Three days after colorectal irradiation rats were sacrificed. Immediately after sacrifice, distal colons were removed, cut along the mesenteric border and mounted in Ussing chambers (Corning Costar Corporation, Harvard Apparatus, France) with a flux area of 1.78 cm². Colonic para-cellular epithelial permeability was measured through the mucosal-to-serosal passage of fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran 4 kDa (FD4; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) added to the mucosal compartment. After 20 min of equilibration, 300 µL of buffer solution on the mucosal side was replaced by 300 µL of FD4 (2.2 mg/mL). After 1-h incubation,

colonic permeability to FD4 was determined by measuring the fluorescence intensity at 485 nm/525 nm using an automatic Infinite M200 microplate reader (Tecan, Lyon, France). Permeability was calculated as the ratio of flux/concentration, as previously described¹³ and expressed in cm/second. Finally, comparison between groups was assessed by calculating relative percentage according to Ctrl PBS permeability.

Colonic protein extraction and Bio-Plex cytokine assay

Colon mucosa proteins were extracted following the instructions for the Bio-Plex Cell Lysis kit (171304011, Bio-Rad). Colonic concentrations of 23 cytokines and chemokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α , VEGF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, GRO/KC, MCP-1, MIP-3 α , MIP-1 α and RANTES) were measured in extracts from colon tissue using the Bio-Plex Pro Rat Cytokine 23 (12005641, Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. This Bio-Plex 200 system uses fluorescently dyed beads to detect different types of molecules in a single well of a 96-microwell plate, requiring low sample volumes. Briefly, premixed beads coated with target antibodies (50 μ L) were added to each well and washed twice with Bio-Plex wash buffer. Standards (8 concentrations ranging from 32000 to 1.95 pg/mL) and samples (50 μ L) were then added to the wells, followed by shaking at 1100 rpm for 30 sec and incubation for 30 min with shaking at 300 rpm at RT. Wells were then washed 3 times with Bio-Plex wash buffer, and premixed detection antibody (25 μ L) was added to the wells. This was followed by shaking at 1100 rpm for 30 sec and incubation for 30 min with shaking at 300 rpm at RT. Wells were again washed 3 times with Bio-Plex wash buffer and streptavidin-PE (25 μ L) was added to the wells. Incubation was for 10 min with shaking at 300 rpm. Wells were washed 3 times with Bio-Plex wash buffer and the beads were resuspended in 125 μ L of Bio-Plex assay buffer. With this technology, relevant inflammatory cytokines could be detected in a single run. Dyed beads are read on the Bio-Plex analyzer. One laser classifies the beads and determines the cytokine that is being detected, and a second laser determines the magnitude of the phycoerythrin-derived signal, which is in direct

proportion to the amount of molecule bound. Cytokine concentrations were derived by interpolating the measured fluorescence intensities to standard curves and by correcting using the corresponding dilution factor employed to achieve the minimum volume for analysis. Bio-Plex Manager software (Bio-Rad) was employed to calculate cytokine concentrations. To avoid inter-assay variations, all samples were analyzed with the same kit on the same day.

Fecal microbiota analysis

Total bacterial DNA was extracted from the fecal samples according to the protocol described in Godon et al¹⁴. DNA concentration, purity, and integrity were determined using a NanoDrop instrument. The size distribution of the extracted DNA estimated by 1% agarose gel electrophoresis showed that most of the DNA was high molecular weight (>20 kb) with no significant shearing. These observations suggest that the extracted DNA was of good quality and suitable for downstream processing.

The V3-V4 hyper-variable region of the 16S rRNA gene was amplified with the primers MSQ-16SV3F (CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCWGCAG) and MSQ-16SV4R (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). The PCR reactions were performed using 10 ng of extracted DNA, 0.5 μ M primer, 0.2 mM dNTP, and 0.5 U of the DNA-free Taq-polymerase, MolTaq 16S DNA Polymerase (Molzym). The amplifications were carried out using the following profile: 1 cycle at 94°C for 60 s, followed by 30 cycles at 94°C for 60 s, 65°C for 60 s, 72°C for 60 s, and finishing with a step at 72°C for 10 min. The resulting PCR products were purified and sent to the @BRIDGE platform (INRA, Jouy-en-Josas) for sequencing using Illumina MiSeq technology.

Sequences were analyzed using the Galaxy-supported pipeline FROGS to produce abundance tables of Operational Taxonomic Units (OTUs) and their taxonomic affiliation (Escudie et al., 2017). The successive steps involved de-noising and clustering of the sequence into OTUs using SWARM; chimera removal using VSEARCH; taxonomic affiliation for each OTU using RDP

Classifier on the SILVA SSU 123 database. Statistical analyses were performed using “R” language and environment version 3.2.3. α - and β -diversity measurements and analysis of the differences in OTUs between samples was performed using the add-on package “Phyloseq”¹⁵.

Statistics

All data are presented as means (SEM). Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by Tukey’s post-test for multiple groups, or a t-test when changes were compared between two groups. Statistical significance was set at $p < .05$.

Differences between the cytokine concentrations were analyzed using generalized least squares (GLS) models with group as nominal covariate (Controls, irradiated and Irradiated+Fprau). The GLS function of the nlme R package offers a variety of variance structure specifications to handle violations of the variance homogeneity assumption in order to obtain correct standard errors and statistical significance. In each case, the selection of the optimal model was conducted using the likelihood ratio for nested models and the AIC otherwise. The significant level was fixed at $p < .05$ after Benjamini–Hochberg discovery rate (FDR) correction.

Results

Prophylactic *F. prausnitzii* treatment reduces radiation-induced histological damage to the colonic epithelium.

The colonic epithelium forms a selective barrier against the penetration of luminal contents *and* then commensal and pathogen bacterial translocation. Physical barrier integrity of the colon was investigated in analyzing structural damage of the colonic epithelium by morphological assessments in the crypt compartment on histology slides. We looked at the presence of crypt morphological atypia (Figure 1). Three days after colorectal irradiation, 37.5% of colonic tissue slides showed low-grade atypia and the other 62.5% high-grade atypia. Prophylactic treatment with *F. prausnitzii* reduced the severity of radiation-induced crypt morphological atypia. Compared to rats subjected to irradiation alone, in those pre-treated with *F. prausnitzii* we observed an inverse proportion in the percentage of slides with low-grade (56.25%) or high-grade (43.75%) epithelial crypt atypia. Our results demonstrate an ability of *F. prausnitzii* to partially protect the structural integrity of the colonic mucosa from colorectal irradiation and suggest it has the potential to preserve the epithelium as a physical barrier against bacterial translocation. To support this assumption the following experiments looked at how *F. prausnitzii* can regulate the function of the colonic epithelial barrier.

Prophylactic *F. prausnitzii* treatment prevents radiation-induced disruption of the function of the colonic epithelial barrier.

Low trans- and/or para-epithelial permeability is a primordial index of the functional integrity of the colonic barrier. In this study, *ex vivo* colonic permeability using Ussing Chamber Systems to measure trans-epithelial permeability to intact horseradish peroxidase (HRP) and para-epithelial permeability to fluorescein isothiocyanate-dextran 4 (FD4) were quantified. At 3 days, colorectal irradiation in rats pre-treated with *F. prausnitzii* did not change trans-epithelial permeability to HRP (data not shown). At the same time after colorectal irradiation, we found

a 2.3-fold increase in para-epithelial permeability to FD4 (Figure 2a, $p < .05$), neutrophil infiltration, as demonstrated by the increased number of MPO-positive neutrophils, expression of GRO/KC (a specific neutrophil chemo-attractant) in the colonic mucosa (Figure 2b, 2d, $p < .05$), and probably antimicrobial activity, as suggested by increased expression of macrophage inflammatory protein 3 α (MIP3 α) by mucosal cells (Figure 2e, $p < .05$). Altogether, these findings point to colonic barrier breakdown 3 days after colorectal irradiation. Pre-treatment with *F. prausnitzii* protected rats from acute radiation-induced para-epithelial hyperpermeability. Permeability values in irradiated rats pre-treated with *F. prausnitzii* remained close to basal level (Figure 2a). *F. prausnitzii* also prevented radiation-induced neutrophil infiltration, as shown by control levels of MPO-positive neutrophils and GRO/KC expression in the colonic mucosa after *F. prausnitzii* administration (Figure 2b, 2d). MIP3 α , remained elevated in irradiated rats pre-treated with *F. prausnitzii* (Figure 2e, $p < .05$).

Prophylactic F. prausnitzii treatment increases resident macrophages in the colonic mucosa of rats subject to colorectal irradiation

Pre-treatment of irradiated rats with *F. prausnitzii* significantly increased by 47.60 % CD68-positive resident macrophages in the colonic mucosa, while in rats not pretreated there was only a trend to increased macrophages (Figure 2c). Resident macrophages of the colon do not proliferate and appear to lack receptor-mediated chemotactic activity. Recruitment of circulating precursor monocytes seems to be the major source of cells that increase the number of resident macrophages after *F. prausnitzii* treatment. The chemokine RANTES plays a role in immune cell recruitment as monocytes, mast cells and lymphocytes, but its expression was reduced in rats not pre-treated and in rats pre-treated with *F. prausnitzii* compared to control rats (Figure 2f, $p < .05$, $p < .01$ respectively). Nevertheless, a borderline significance ($p = .06$) increase in MCP-1 in the colonic mucosa is suggestive of monocyte recruitment (Figure 2g). Our results also suggest that potential recruited monocytes could be differentiating into

macrophages, as the radiation-increased MIP-3 α level in the colonic mucosa remained high in rats receiving *F. prausnitzii* treatment¹⁶ (Figure 2e).

The protective effect of *F. prausnitzii* is independent of an effect on gut microbiota composition

We investigated whether colorectal irradiation with or without pre-treatment by *F. prausnitzii* involved modifications of the gut microbiota by analyzing the intestinal bacterial composition of the different experimental groups (Figure 3). We found no differences between groups in α -diversity, which measures the taxonomic richness of the fecal microbiota communities (Figure 3a). In addition, β -diversity analysis, which measures the degree of similarity between the gut microbial communities, revealed no clustering of the rats according to the *F. prausnitzii* or PBS pre-treatments before irradiation (Figure 3b). Bacteria composition analysis at phyla level showed no differences between groups (Figure 3c).

Prophylactic *F. prausnitzii* treatment increases the production of the cytokine IL-18 by crypt epithelial cells of irradiated rats.

To study the acute and local inflammatory response to colorectal irradiation and to shed light on the mechanisms involved in the ability of *F. prausnitzii* to protect the colonic barrier from radiation toxicity, we assessed the mucosal profile and concentration of 17 cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, M, CSF and GM-CSF) using a Bio-Plex assay (Figure 4a-b, S1). At 3 days, colorectal irradiation did not change the expression level of any measured cytokines from the colonic mucosa. Nevertheless, in rats receiving prophylactic *F. prausnitzii* treatment, colorectal irradiation induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 by mucosal cells (Figure 4a-b, irradiated rats vs irradiated and *F. prausnitzii* treatment $p < .05$). As increased levels of IL-1 β and IL-18 cytokines were not seen after irradiation alone (Figure 4a-b) or after bacteria administration alone (data not shown), it is likely that *F. prausnitzii* treatment and

radiation exposure induced synergic effects on the production of these cytokines by colonic mucosal cells. In the colonic mucosa, IL-18 is expressed in a wide range of immune cells like macrophages as well as in epithelial cells. Immunohistochemistry on colonic tissue slides was performed to study the cellular origin of IL-18 production after *F. prausnitzii* treatment (Figure 4c). Even though we observed immunostaining of IL-18 in some immune cells localized in the lamina propria of the colonic mucosa (Figure 4c, arrow), epithelial cells were the major source of its production. In control rats, we observed cytoplasmic immunostaining of IL-18 in the entire array of crypt epithelial cells. At 3 days, colorectal irradiation slightly reduced IL-18 production and immunostaining was more diffuse in the epithelial cytoplasm. In comparison with control rats, pre-treatment of irradiated rats with *F. prausnitzii* increased IL-18 production by epithelial cells, mostly those localized at the base of the crypt, suggesting an enhancement of basal production of IL-18 in the progenitor/stem cell compartment of the mucosa. We then analyzed if increased IL-18 production by epithelial cells at the crypt base was associated with regulation of stem/progenitor cells.

Prophylactic F. prausnitzii protects a pool of crypt epithelial progenitor/stem cells and differentiated epithelial tuft cells from colorectal irradiation.

We assessed the number of epithelial stem/progenitor cells on colon histology slides stained by Sox-9 antibody (Figure 5a, 5c). The number of Sox-9-positive stem/progenitor cells per crypt had decreased by 14.30 %, 3 days after colorectal irradiation (28.93 ± 0.15 in control rats vs 24.79 ± 0.21 in irradiated rats, $p < .001$). In irradiated rats receiving prophylactic *F. prausnitzii* treatment, the number of Sox-9-positive cells stayed close to control level, with a slight but significant increase (29.87 ± 0.23 in irradiated and *F. prausnitzii* treatment vs 28.93 ± 0.15 in control rats, $p = .0013$). This demonstrated that *F. prausnitzii* pre-treatment prevented radiation-induced loss of crypt epithelial stem/progenitor cells. We then investigated the ability of *F. prausnitzii* to preserve epithelial differentiated cells after colorectal irradiation. We focused on tuft cells, which are identified as an anatomically and functionally distinct epithelial cell entity.

They are key regulatory intestinal niche cells and may well constitute one of the niche components¹⁷. We measured the number of tuft cells on colon histology slides stained by Dclk1 antibody (Figure 5b, 5d). In the colonic mucosa of control rats, there were an estimated 303.90 ± 15.10 Dclk1-positive tuft cells per slide. Three days after colorectal irradiation, the number of Dclk1-positive cells was only 195.7 ± 18.88 , corresponding to a decrease of 35.6% of tuft cells ($p < .001$), and remained at control level in rats pretreated with *F. prausnitzii* (264.90 ± 26.10). This shows that prophylactic *F. prausnitzii* treatment also protects colonic differentiated Dclk1-positive tuft cells from colorectal irradiation. After luminal infection by helminth parasites, cytokine IL-25 secreted by tuft cells stimulates stem/progenitor cells to regulate epithelial remodeling^{18,19}. In Figure 5e, we analyzed double staining of colon histology slides by Dclk1 and IL-25 antibody. In control rats, we found that among 303.90 ± 67.53 Dclk1-positive tuft cells per slide only 13.20 ± 3.65 produce cytokine IL-25. Three days after colorectal irradiation, co-staining by Dclk1 and IL-25 was observed in 1.87 ± 0.77 tuft cells per slide, corresponding to an 85.80 % decrease compared to controls ($p < .01$). In irradiated rats pretreated with *F. prausnitzii*, the number of tuft cells co-stained by Dclk1 and IL-25 remained at basal level (10.41 ± 1.92). *F. prausnitzii* also preserved the basal level of differentiated tuft cells that could provide an optimal microenvironment for stem cell function.

Prophylactic F. prausnitzii treatment maintains self-renewal of colonic epithelium exposed to radiation and reduces mucosal ulceration

We were then interested by the renewal ability of colonic epithelium, enhancement or maintenance of which in response to exogenous stressors is key to physical barrier integrity. We first studied whether *F. prausnitzii*-induced protection of crypt epithelial stem/progenitor cells and tuft cells in irradiated rats was also associated with the ability of crypt epithelial cells to proliferate. We analyzed the number of proliferating crypt epithelial cells on histology colon slides stained by PCNA antibody (Figure 6a-b). The proliferative rate of crypt epithelial cells fell from 71.60 ± 0.31 % of proliferative PCNA-positive cells per crypt in control rats to 64.70

± 0.39 % in irradiated rats at 3 days ($p < .001$). *F. prausnitzii* pre-treatment stabilized at basal level the proliferation of the entire array of crypt epithelial cells, including crypt stem/progenitor cells. We then measured the crypt depth, which in the colon is a criterion for mucosal thickness (Figure 6c). At three days, colorectal irradiation induced partial atrophy of the crypt (7.02 % reduction of crypt depth, 202.90 ± 1.51 μm in irradiated rats vs 218.24 ± 1.58 μm in control rats, $p < .001$). Pre-treatment of irradiated rats with *F. prausnitzii* maintained crypt depth at control level (220.70 ± 1.72 μm in irradiated and *F. prausnitzii* pre-treated rats vs 218.24 ± 1.58 μm in control rats). These results demonstrate the ability of *F. prausnitzii* pre-treatment to preserve the basal level of epithelial self-renewal even if rats are exposed to colorectal irradiation and support its acute effects on the preservation of colonic epithelial barrier integrity. The benefit provided by *F. prausnitzii* pre-treatment was sustainable until 7 days after colorectal irradiation (Figure 6c, Supplementary materials and methods). Prophylactic *F. prausnitzii* treatment reduced by 52.80 % colorectal irradiation-induced mucosal ulceration at 7 days (4546.50 ± 650.08 μm in irradiated rats vs 2146.70 ± 458.50 μm in irradiated rats treated with *F. prausnitzii*; $*p < .01$).

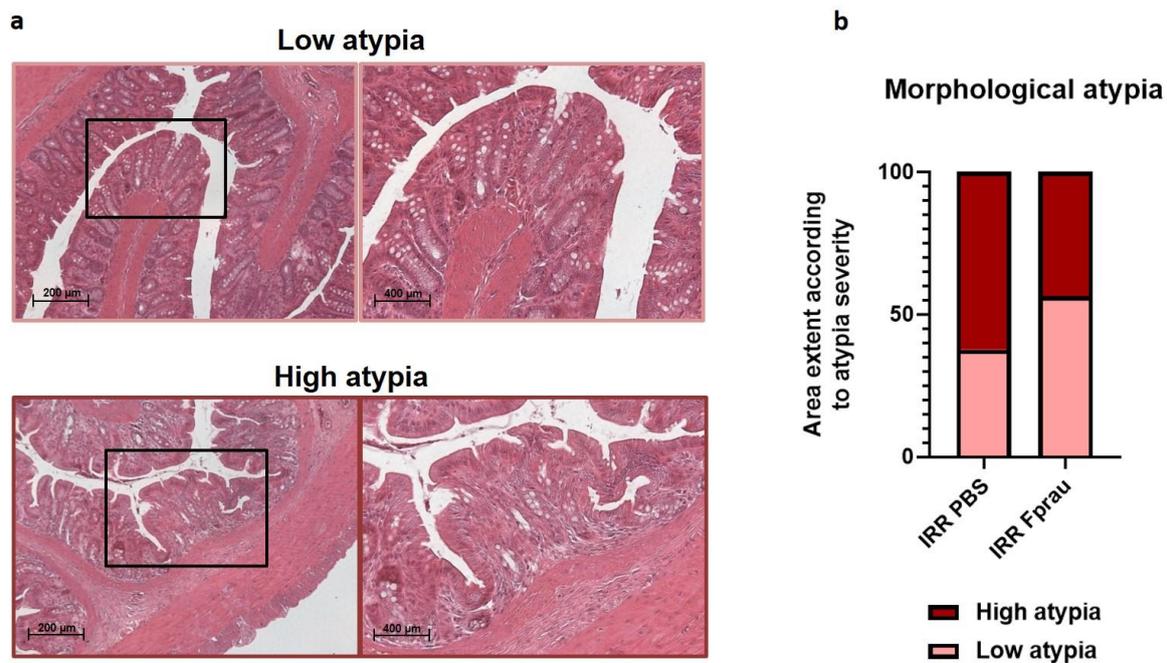


FIGURE 1

Figure 1. Effect of prophylactic *F. prausnitzii* treatment on 29 Gy colorectal irradiation-induced histological damage to the colonic mucosa at 3 days.

(a) Colonic sections were stained with hematoxylin, eosin and saffron (HES). Sections show representative histological morphological change of the colonic mucosa. Low-grade crypt atypia are characterized by organized colonic epithelial crypts with modest edema and crypt detachment from muscularis mucosa (top pictures). High-grade crypt atypia are characterized by disorganized and deformed colonic epithelial crypts with strong edema and crypt detachment from muscularis mucosa (bottom pictures). Scale bars 200 and 400 μm . (b) Histogram representing the percentage of colonic sections showing low- (in pink) or high-grade (in red) crypt atypia in irradiated animals or in irradiated and *F. prausnitzii*-treated animals. Analyses were performed on 20 sections per animal and 5 animals were used per group (N=1). IRR=Irradiated, Fprau=*F. prausnitzii*.

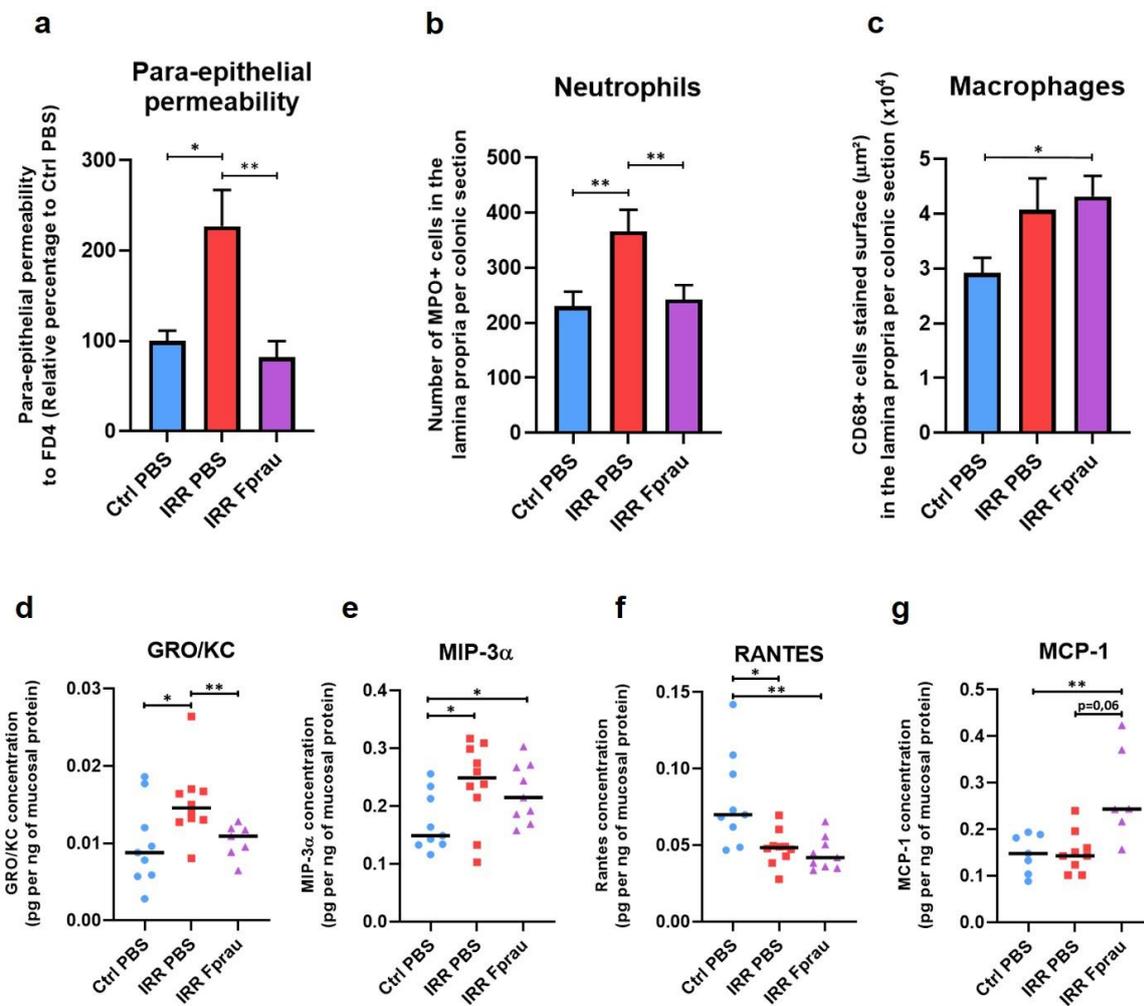


FIGURE 2

Figure 2. Effect of prophylactic *F. prausnitzii* treatment on 29 Gy colorectal irradiation-induced epithelial barrier breakdown at 3 days.

(a) Measurement of *ex vivo* colonic para-epithelial permeability to FD4 using Ussing chambers. Each value represents the average of 2 independent measurements per animal (15-20 animals per group) and is for independently repeated experiments (N=3). (b) Immunohistological quantitative analysis of neutrophil infiltration in the colonic lamina propria. Colonic sections were stained by myeloperoxidase (MPO) antibody. The number of MPO-positive cells was quantified in the lamina propria and per colonic section. (c) Immunohistological quantitative analysis of resident macrophages in the colonic lamina propria. Colonic sections were stained by CD68 antibody. The area in μm^2 of CD68-positive cells stained was quantified in the lamina propria and per colonic section. For b and c, the histograms represent the average of 4 independent measurements per animals (5 animals per group (N=1)). Ctrl= Controls, IRR=Irradiated, Fprau=*F. prausnitzii*. Error bars represent S.E.M. * $p < .05$, ** $p < .01$. (d,e,f,g) Graphs represent the expression in the colonic mucosa of the chemokines GRO-KC, MIP-3 α , RANTES and MCP-1 in control animals, irradiated animals or irradiated and *F. prausnitzii*-treated animals. ELISA multiplex assays were performed at least in duplicate per animal and 9 to 10 animals were used per group (N=1). Ctrl= Controls, IRR=Irradiated, Fprau=*F. prausnitzii*. Error bars represent S.E.M, * $p < .05$, ** $p < .01$.

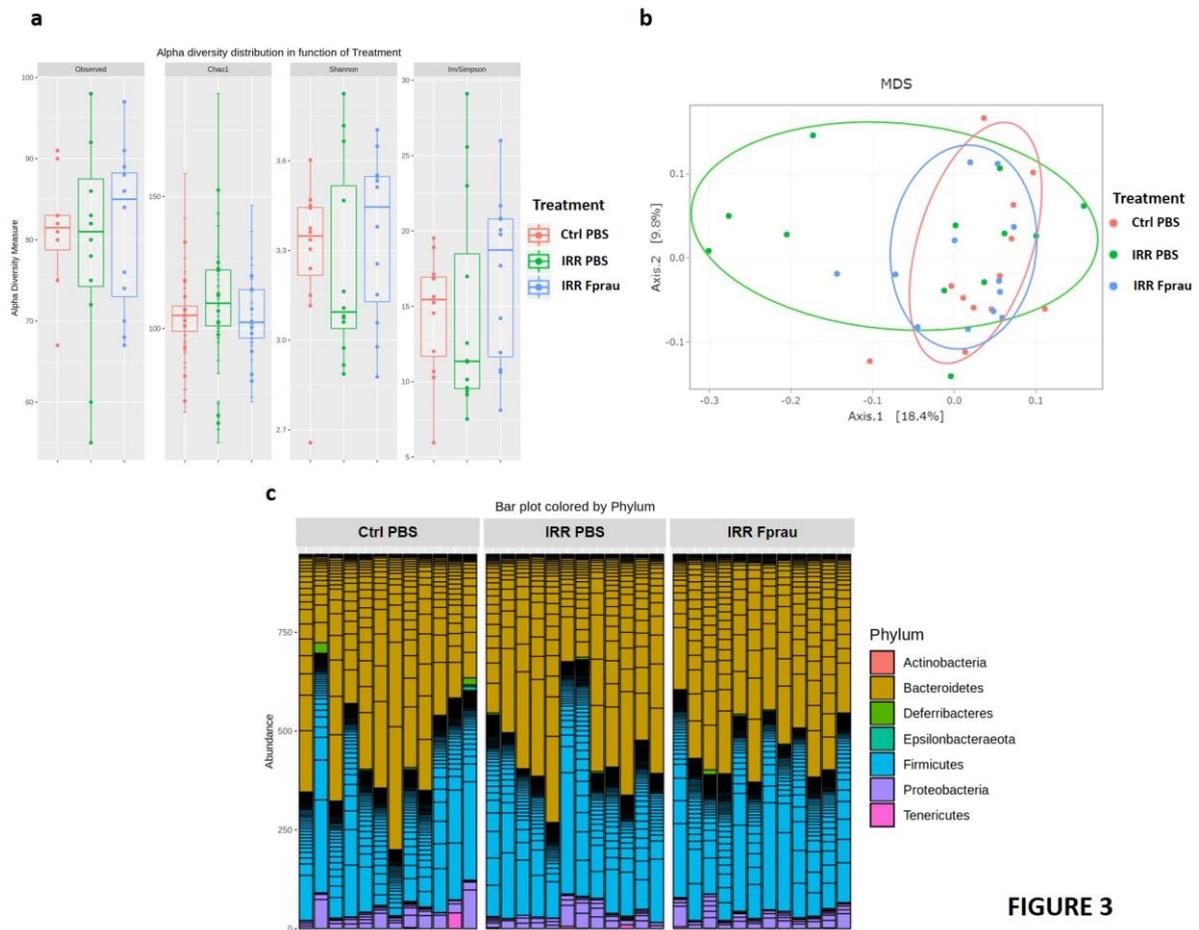


FIGURE 3

Figure 3: Microbiota composition analysis after 29 Gy colorectal irradiation in rats treated or not by *F. prausnitzii*.

(a) 16S rRNA-sequencing-based alpha diversity analysis, measured by Observed, Chao1, Shannon and invSimpson index in control, irradiated and *F. prausnitzii*-irradiated animals. **(b)** Principal Coordinates of analysis of all animals, confidence ellipses appear around each group. **(c)** Bacteria phyla analysis in all animals. 12 animals were used per group for these analyses (N=1). Ctrl= Controls, IRR=Irradiated, Fprau=*F. prausnitzii*.

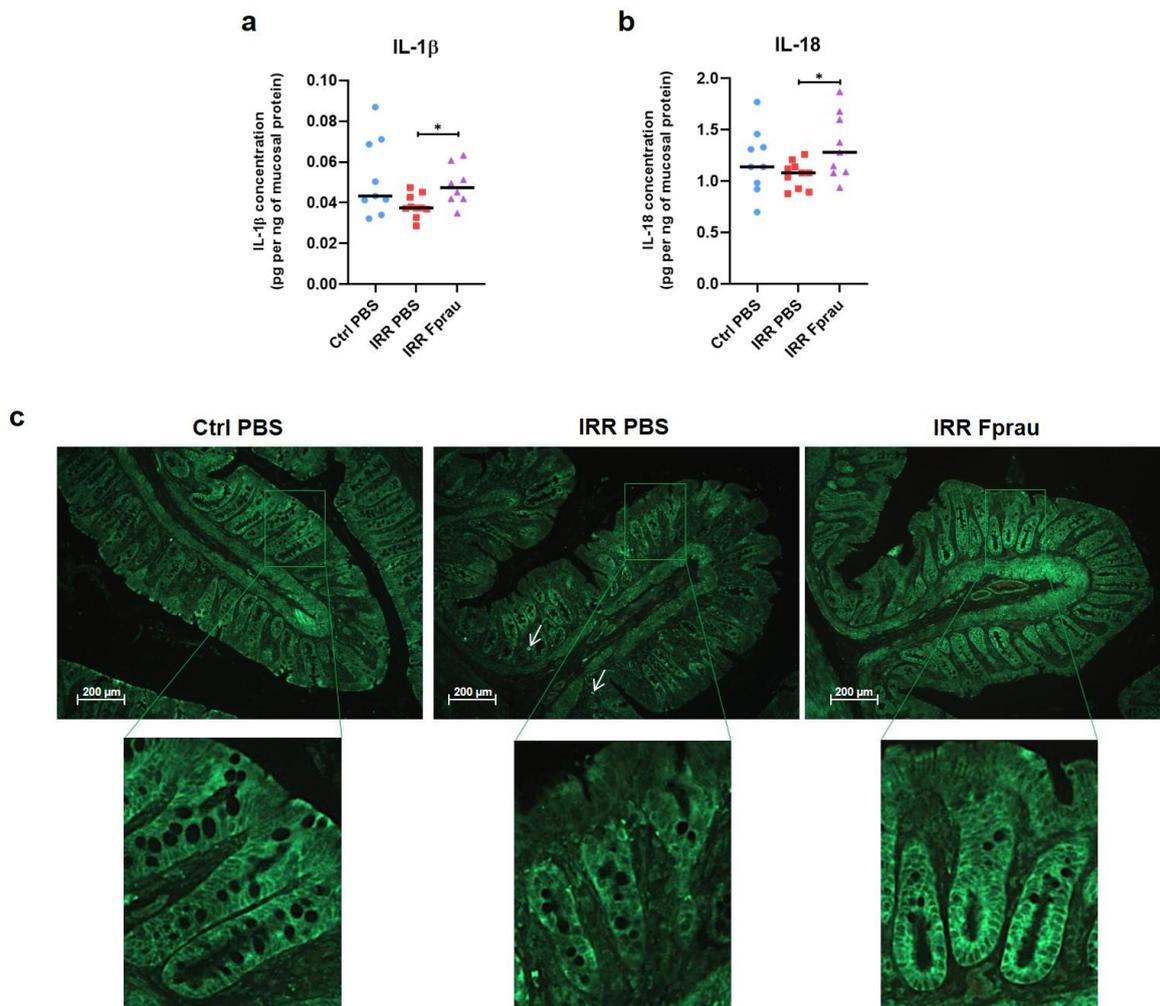


FIGURE 4

Figure 4. Effect of prophylactic *F. prausnitzii* treatment on IL-1 β and IL-18 production by colonic mucosal cells 3 days after 29 Gy colorectal irradiation.

(a, b) Graphs representing expression in the colonic mucosa of IL-1 β and IL-18 in control animals, irradiated animals or irradiated and *F. prausnitzii*-treated animals. ELISA multiplex assays were performed at least in duplicate per animal and 9 to 10 animals were used per group (N=1). Error bars represent S.E.M, *p< .05. (c) Representative pictures of immunofluorescence staining of colonic sections by IL-18 antibody (green) in control animals, irradiated animals (arrows show IL-18-positive immune cells) and irradiated and *F. prausnitzii*-treated animals. Scale bar 200 μ m. Ctrl= Controls, IRR=Irradiated, Fprau=*F. prausnitzii*.

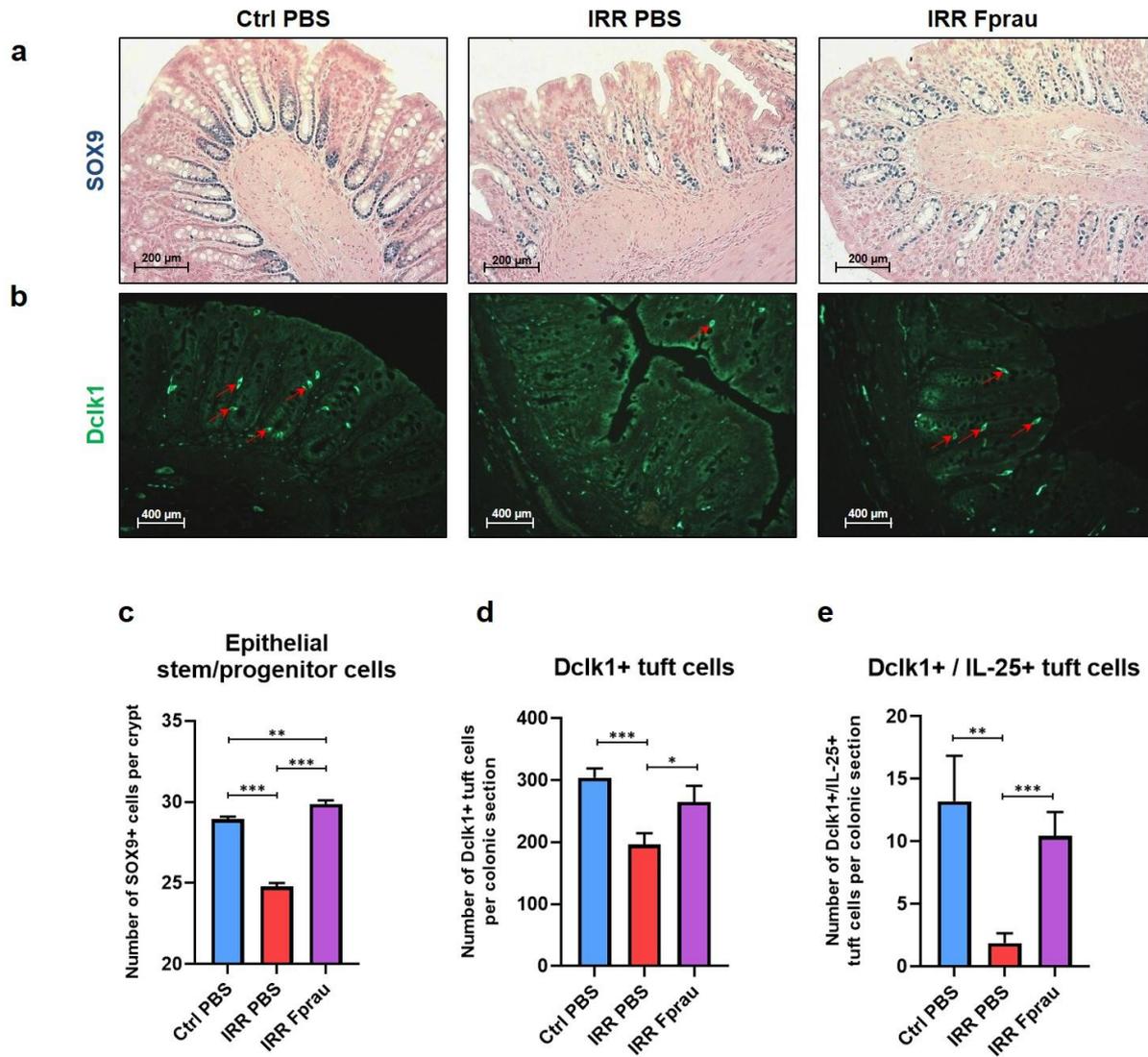


FIGURE 5

Figure 5: Effect of prophylactic *F. prausnitzii* treatment on 29 Gy colorectal irradiation-induced reduction of stem/progenitor cells and tuft cells at 3 days.

Representative pictures of (a) immunohistochemistry staining of colonic sections by SOX9 antibody (blue) and nuclear fast red (pink) counterstain for the quantification of crypt stem/progenitor cells, (b) immunofluorescence staining of colonic sections by Dclk1 antibody for the quantification of tuft cells (green). Sections show control animals, irradiated animals and irradiated and *F. prausnitzii*-treated animals. Scale bars 200 and 400 μ m. Histograms representing (c) the number of SOX9-positive cells per crypt, (d) the number of Dclk1-positive tuft cells per colonic section and (e) the number of Dclk1- and IL-25-positive tuft cells per colonic section. Histogram (c) represents the average of 50-60 independent measurements per animal (n=5 animals per group, N=1), histograms (d) and (e) histograms represent the average of 4 independent measurements per animals (5 animals per group (N=1)). Ctrl=Controls, IRR=Irradiated, Fprau=*F. prausnitzii*. Error bars represent S.E.M, *p< .05, **p< .01, ***p< .001.

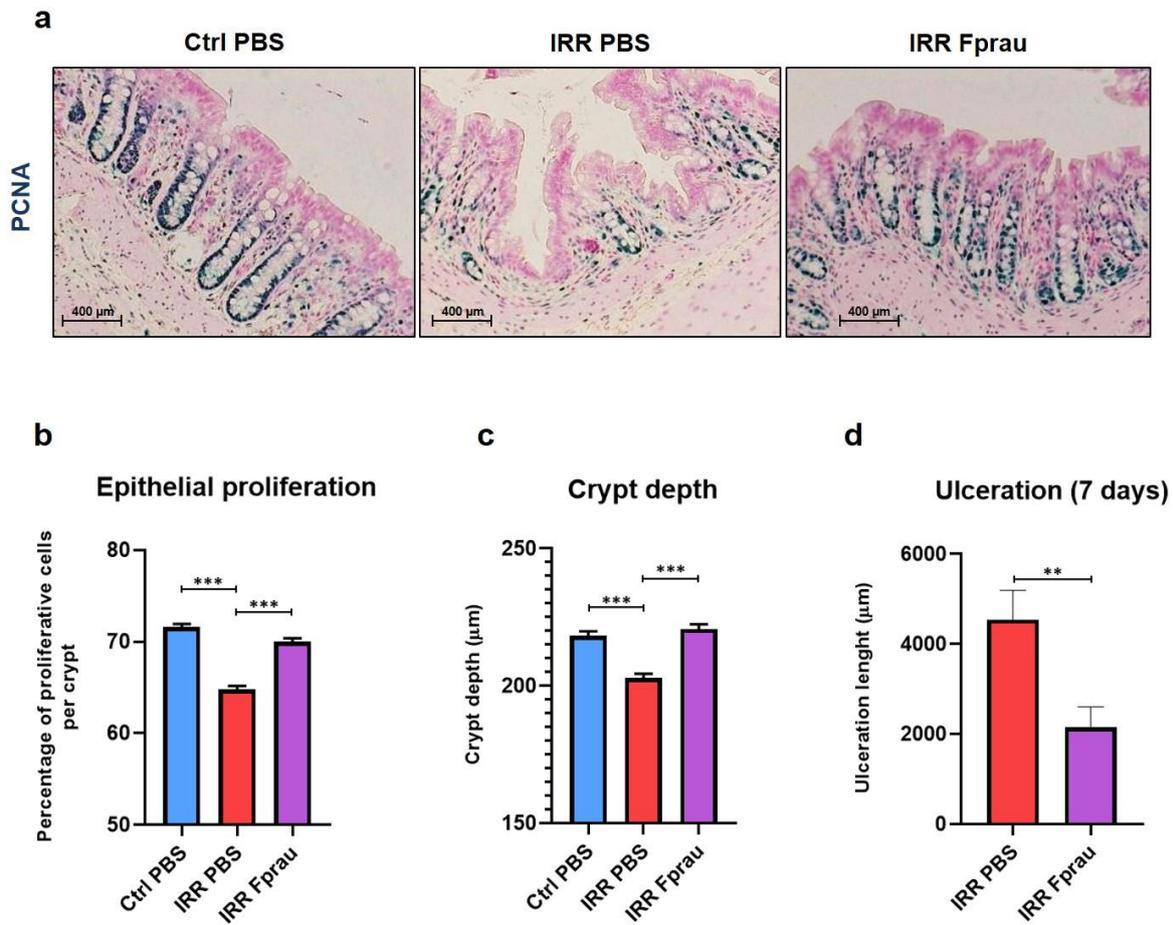


FIGURE 6

Figure 6. Effect of prophylactic *F. prausnitzii* treatment on 29 Gy colorectal irradiation-induced decrease of colonic mucosa renewal at 3 days and ulceration at 7 days.

(a) Representative pictures of immunohistochemistry staining of colonic sections by PCNA antibody (in blue) and nuclear fast red (in pink) counterstain for the quantification of crypt epithelial proliferation in control animals, irradiated animals and irradiated and *F. prausnitzii*-treated animals. Scale bar 400 µm. (b) Histogram representing the percentage of proliferative PCNA-positive cells per crypt of the colon. Histograms representing quantitative analysis (c) of colonic crypt depth (µm) in each group at 3 days and (d) length of mucosal ulceration (µm) in irradiated rats and irradiated and *F. prausnitzii*-treated rats at 7 days, colonic sections were stained with hematoxylin, eosin and saffron (HES). For b and c, each value of the histogram represents the average of 50-60 independent measurements per animal (n=5 animals per group, N=1). For d, each value corresponds to the average of 5 independent measurements per animal (n=8 animals per group, N=1). Error bars represent S.E.M, **p< .01, ***p< .001 Ctrl=Controls, IRR=Irradiated, Fprau=*F. prausnitzii*.

Discussion

This study demonstrated that prophylactic treatment with *F. prausnitzii* induces an acute protection of the colonic mucosal barrier from radiation exposure and therefore maintains its functional integrity. The therapeutic benefit of *F. prausnitzii* after irradiation is provided by its ability to prevent the increase of para-epithelial permeability, to enhance epithelial self-renewal and to preserve differentiated epithelial cells. The maintenance of colonic barrier integrity by *F. prausnitzii* is associated with macrophage recruitment and cytokine production by mucosal cells, mostly epithelial cells, as shown specifically for IL-18. We also found that *F. prausnitzii* treatment preserves colonic Dclk1/IL25 positive tuft cells.

Colorectal irradiation led to enhancement of colonic para-epithelial permeability and to neutrophil infiltration in the mucosa, which are indexes of mucosal barrier breakdown. We also quantified in the colonic mucosa a significant increase of the chemokine GRO/KC, a specific neutrophil chemoattractant, which is suggestive of a perpetuating cycle of neutrophil recruitment. We also showed in the mucosa a significant increase of macrophage inflammatory protein 3 α (MIP3 α), which is provided mostly by epithelial cells, but also by other cells such as innate and adaptative immune cells^{16,20,21}. Given that MIP3 α is co-expressed with its physiological receptor CCR6 in neutrophils and that CCR6 expression is increased in activated neutrophils²², we propose the possibility of autocrine and/or paracrine signaling involving MIP3 α , which increases neutrophil recruitment within colonic mucosa after irradiation. Moreover, by its antimicrobial activity²³, increased secretion of MIP3 α by other mucosal cells may, in synergy with neutrophil recruitment and activation, help protect against bacterial invasion.

Gerassy-Vainberg et al²⁴ showed that targeted rectal radiation induced time-dependent modification of fecal microbiota composition and that the radiation-induced unique microbial signature was most in evidence at 6 weeks. In our experimental conditions, 3 days after

colorectal irradiation seems to be too short a time to identify a shift in fecal microbial composition. Moreover, 3 days after irradiation, we noted no modification of the production by mucosal cells of pro-inflammatory cytokines, and even quantified a significant decrease in the chemokine RANTES. Expression of RANTES is increased in activated epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, monocytes/macrophages within hours of stimulation²⁵ and is induced late (3-5 days) after T lymphocyte activation²⁶. Colorectal irradiation-induced decrease in the expression of RANTES may be due to the radiosensitivity of many mucosal cell types leading to the deregulation of their molecular machinery and/or their death and then to malfunction of the local immune response. RANTES promotes the recruitment and activation of immune cells such as monocytes²⁷, mast cells and T lymphocytes²⁸, which are involved in the late phase of inflammation and have been described to play a key role in the progression from acute to chronic colitis in a model of inflammatory bowel disease²⁹. As RANTES is decreased and MCP-1 unchanged by colorectal irradiation, the recruitment of macrophages seems to be restricted. Decrease in RANTES probably also suggests that the recruitment of other immune cells like T lymphocytes may be limited. This assumption is supported by previous data. A decline in the number of lymphocytes in the peripheral blood has been reported in patients undergoing radiotherapy³⁰. After total body irradiation of rodents, lymphocyte reduction has also been noted and is associated with decreases in the proliferative ability of lymphocytes derived from spleen and thymus and in some plasma pro-inflammatory cytokines³¹. We can also speculate that 3 days after colorectal irradiation, specific local and systemic adaptive immune responses may not yet be implemented. In conclusion, our results seem to be consistent with an acute and nonspecific innate inflammatory response to colorectal irradiation at 3 days, with mostly phagocytic and antimicrobial effects.

Prophylactic treatment with *F. prausnitzii* had a protective effect on radiation-induced impairment of the colonic mucosal barrier. We first demonstrated that oral administration of *F. prausnitzii* prevented radiation-induced increase in acute (3 days) para-epithelial permeability

and in the non-specific innate inflammatory response orchestrated by neutrophils after their mobilization (reduction of the number of neutrophils and GRO/KC expression in the colonic mucosa). The protective effect of *F. prausnitzii* on hyperpermeability has already been shown in a model of inflammatory bowel disease with chronic low-grade inflammation^{10,11}. In rodents receiving *F. prausnitzii* treatment for management of acute colitis, histological examination of the colon showed, as we quantified in our study in the colonic mucosa, a relatively low level of neutrophil infiltration⁸. *F. prausnitzii* also reduced MPO activity in a model of inflammatory bowel disease with chronic mild/severe grade colitis³², thus underlining the ability of *F. prausnitzii* to reduce neutrophil activation in this context. Results obtained by Sokol et al demonstrated an ability of *F. prausnitzii* supernatant (SN) to reduce *in vitro* IL-1 β -induced IL-8 secretion by colonic epithelial cells (caco-2 cells)⁶. As IL-8 is known to be involved in neutrophil recruitment, the findings of Sokol et al support our results and also suggest involvement of epithelial activation in *F. prausnitzii* metabolite effects.

In several experiments, one mechanism proposed to explain the therapeutic benefits of *F. prausnitzii* is its anti-inflammatory properties. This effect was robustly demonstrated *in vitro* on human PBMCs and on human venous monocytes. Among various strains tested on PBMC, *F. prausnitzii* is one of the bacteria with the weakest ability to induce Th1 pro-inflammatory cytokines (IL-12 and INF- γ) and with the highest ability to induce anti-inflammatory IL-10. *F. prausnitzii* or its SN also increased in human PBMC and in human venous macrophages the IL-10/IL-12 ratio, which is an index of the anti-inflammatory profile effect^{6,7}. The local colonic anti-inflammatory properties of *F. prausnitzii* were also tested *in vivo* in inflammatory bowel disease models, but the results are less significant after live *F. prausnitzii* administration than after SN administration. Sokol et al⁶ reported that live *F. prausnitzii* administration prevents acute TNBS-induced increase in the pro-inflammatory cytokine IL-12, but only tends to increase the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the colon. Some other pro-inflammatory

cytokines are also reduced by live *F. prausnitzii* administration in the colon of mouse with chronic low-grade inflammation: TNF- α , IFN- γ and IL-6^{10,11}.

In our study, *F. prausnitzii* administration significantly enhanced resident macrophages. With reference to previous work^{6,7}, such an increase might indicate a potential anti-inflammatory effect of *F. prausnitzii* via macrophage activation and an ability to modulate macrophage production of IL-10 and IL-12. This assumption seems to be unsupported by our analyses of cytokine profiles in the colonic mucosa. Indeed, the ratio of anti-inflammatory IL-10 to pro-inflammatory IL-12 was similar in control and irradiated animals pre-treated or not by *F. prausnitzii* (data not shown). So, in our experimental context, in which colorectal irradiation induced at 3 days a moderate and non-specific immune response without a change in fecal microbiota composition or in local pro-inflammatory cytokine production, we noted no anti-inflammatory effects after *F. prausnitzii* administration.

Surprisingly, in rats receiving *F. prausnitzii*, irradiation led to up-regulation of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 by colonic mucosal cells. In a context in which the luminal level of *F. prausnitzii* could be increased, cell stress induced by irradiation should provide increased danger signals which may stimulate NOD-like receptor (NLR) inflammasome signaling, leading to IL-1 β and IL-18 activation and production by mucosal cells. It was previously reported that NLR inflammasome activation may be either regenerative or deleterious, depending on the cell type in which it is activated³³.

In response to colitis, acute or chronic NLR inflammasome activation in colonic epithelial cells and the subsequent production and secretion of IL-18 seem to be critical for maintaining microbiota stability, colonic homeostasis/regeneration, and barrier integrity against bacterial translocation^{34,35}, whereas chronic NLR activation in immune cells like macrophages seems to have a pro-inflammatory effect³³. The severity of colonic injury may be modulated by shifting the balance between protective and damaging effects depending on the inflammatory context and the experimental conditions. In our experimental conditions, we found that *F. prausnitzii*

treatment preserves colonic mucosal barrier integrity after irradiation and increases IL-18 production mostly by epithelial cells. So, in this context, the balance between regenerative and deleterious effects is probably in favor of protection via epithelial cell activation. Further experiments are needed to assess the relative impact of IL-18 produced by crypt epithelial cells in the protective effect of *F. prausnitzii*.

Prophylactic treatment with *F. prausnitzii* also decreased histological damage to the epithelium at 3 days, leading to a reduced area of mucosal ulceration at 7 days. In our experimental conditions, *F. prausnitzii* treatment was unable to minimize radiation-induced apoptosis of crypt epithelial cells in the colonic mucosa (S2). Nevertheless, we showed for the first time that its therapeutic benefit at 3 days is related to its ability to preserve mucosal self-renewal through the maintenance of an activated pool of stem/progenitor cells and of epithelial cell proliferation. Macrophages play a key role in coordinating signals from luminal microbiota and injured colonic epithelium and thereby transmit regenerative inputs to colonic progenitor cells^{36,37}. Recently, macrophages have been reported to be essential for the regenerative response of the intestine to lethal abdominal irradiation by rescuing LGR5+ intestinal stem cells³⁷. In the context of radiation-induced dysregulation of colonic epithelial self-renewal, increase of resident macrophages by *F. prausnitzii* treatment may play a role in the protection of the epithelial progenitor/stem cell compartment and so may help maintain colonic barrier integrity. Recent *in vivo* and *in vitro* studies suggest that radiation induces pyroptosis in bone marrow-derived macrophages by activation of the NLR inflammasome and by production of IL-1 β and IL-18³⁸. Depending on NLR inflammasome activation in immune cells, the acute protective effect of macrophages may be reduced over time, but chronic deleterious effects may be avoided.

Finally, after prophylactic *F. prausnitzii* treatment, differentiated epithelial cells like Dclk1-positive tuft cells were also preserved from radiation-induced loss. The use of Villin-Cre; Dclk1^{fllox/fllox} mice, which are specifically deficient in Dclk1 in the epithelial cells of the intestine,

showed the involvement of this enzyme in regeneration of the epithelium of the small intestine after whole-body irradiation. Dclk1 mainly produced by the tuft cells in the epithelium seem to have a radioprotective effect on stem/progenitor cells^{39,40}. In the absence of Dclk1 expression by tuft cells, irradiation-surviving stem/progenitor cells appear to lose their ability to provide epithelial repair and Dclk1 deletion seems to have an impact on animal survival. In the present study, the preservation of Dclk1-positive tuft cells by *F. prausnitzii* administration may have protected the colonic mucosa from radiation-induced damage. As chemosensory and secretory cells, tuft cells orchestrate the sensing of luminal content, the stromal immune response and regeneration of intestinal epithelial cells through the secretion of IL-25^{18,19,41}. We showed that some tuft cells quantified in control rats or after irradiation in rats treated with *F. prausnitzii* also expressed IL-25 cytokine, whereas after irradiation alone they did not or did so rarely. This result points to the potential involvement of tuft cells in the prophylactic effects of *F. prausnitzii* on colonic mucosa self-renewal, through Dclk1 and/or IL-25 production. Further experiments are needed to demonstrate robustly the role played by tuft cells in the efficacy of *F. prausnitzii* against radiation toxicity.

In a context of radiation-induced colonic damage, we have demonstrated for the first time that prophylactic *F. prausnitzii* treatment favors the reinforcement of the colonic mucosal barrier leading to radioprotective effects. We have established that *F. prausnitzii* prevents radiation-induced para-permeability and the associated acute non-specific immune response, but also preserves epithelial integrity. Our results suggest that epithelial cell activation is involved in the benefits of acute *F. prausnitzii* treatment and that tuft cells could play a key role. Our study opens new perspectives in the protection of colonic mucosa from radiation toxicity using prophylactic *F. prausnitzii* treatment. New-generation probiotics might be a real hope in reducing acute side effects in patients who undergo pelvic radiotherapy. It has also been suggested that the severity of acute radiation toxicity may predict the severity of chronic symptoms, known as consequential late damage⁴². Therefore, *F. Prausnitzii*-induced acute

protection may be beneficial in reducing late side effects. Clinical use of *F. Prausnitzii* could help improve the quality of life of these patients.

Acknowledgements

The authors thank GSEA of the IRSN for technical assistance with animals

Competing financial interest declaration

The authors declare no conflict of interest

References

1. Andreyev HJ, Wotherspoon A, Denham JW, Hauer-Jensen M. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *The Lancet Oncology* 2010; 11:310-2.
2. Moussa L, Usunier B, Demarquay C, Benderitter M, Tamarat R, Semont A, et al. Bowel Radiation Injury: Complexity of the Pathophysiology and Promises of Cell and Tissue Engineering. *Cell transplantation* 2016; 25:1723-46.
3. Ferreira MR, Muls A, Dearnaley DP, Andreyev HJ. Microbiota and radiation-induced bowel toxicity: lessons from inflammatory bowel disease for the radiation oncologist. *The Lancet Oncology* 2014; 15:e139-47.
4. Wang A, Ling Z, Yang Z, Kiela PR, Wang T, Wang C, et al. Gut microbial dysbiosis may predict diarrhea and fatigue in patients undergoing pelvic cancer radiotherapy: a pilot study. *PloS one* 2015; 10:e0126312.
5. Manichanh C, Varela E, Martinez C, Antolin M, Llopis M, Dore J, et al. The gut microbiota predispose to the pathophysiology of acute postradiotherapy diarrhea. *The American journal of gastroenterology* 2008; 103:1754-61.
6. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105:16731-6.
7. Zhang M, Qiu X, Zhang H, Yang X, Hong N, Yang Y, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PloS one* 2014; 9:e109146.
8. Zhou L, Zhang M, Wang Y, Dorfman RG, Liu H, Yu T, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflammatory bowel diseases* 2018.
9. Huang XL, Zhang X, Fei XY, Chen ZG, Hao YP, Zhang S, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation. *World journal of gastroenterology* 2016; 22:5201-10.
10. Laval L, Martin R, Natividad JN, Chain F, Miquel S, Desclee de Maredsous C, et al. *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut microbes* 2015; 6:1-9.
11. Martin R, Miquel S, Chain F, Natividad JM, Jury J, Lu J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC microbiology* 2015; 15:67.
12. Qiu X, Zhang M, Yang X, Hong N, Yu C. *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *Journal of Crohn's & colitis* 2013; 7:e558-68.
13. Artursson P, Magnusson C. Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Journal of pharmaceutical sciences* 1990; 79:595-600.
14. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and environmental microbiology* 1997; 63:2802-13.
15. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one* 2013; 8:e61217.
16. Hausmann M, Bataille F, Spoettl T, Schreiter K, Falk W, Schoelmerich J, et al. Physiological role of macrophage inflammatory protein-3 alpha induction during maturation of intestinal macrophages. *J Immunol* 2005; 175:1389-98.
17. Middelhoff M, Westphalen CB, Hayakawa Y, Yan KS, Gershon MD, Wang TC, et al. *Dcl1*-expressing tuft cells: critical modulators of the intestinal niche? *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2017; 313:G285-G99.
18. Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, et al. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 2016; 529:226-30.
19. von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 2016; 529:221-5.

20. Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani S, et al. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *European journal of immunology* 2001; 31:1981-8.
21. Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; 51:818-26.
22. Yamashiro S, Wang JM, Yang D, Gong WH, Kamohara H, Yoshimura T. Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. *Blood* 2000; 96:3958-63.
23. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, et al. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *Journal of leukocyte biology* 2003; 74:448-55.
24. Gerassy-Vainberg S, Blatt A, Danin-Poleg Y, Gershovich K, Sabo E, Nevelsky A, et al. Radiation induces proinflammatory dysbiosis: transmission of inflammatory susceptibility by host cytokine induction. *Gut* 2018; 67:97-107.
25. Lokuta MA, Maher J, Noe KH, Pitha PM, Shin ML, Shin HS. Mechanisms of murine RANTES chemokine gene induction by Newcastle disease virus. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271:13731-8.
26. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annual review of immunology* 1990; 8:421-52.
27. Meurer R, Van Riper G, Feeney W, Cunningham P, Hora D, Jr., Springer MS, et al. Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8. *The Journal of experimental medicine* 1993; 178:1913-21.
28. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990; 347:669-71.
29. Ajuebor MN, Hogaboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AE, Wallace JL. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J Immunol* 2001; 166:552-8.
30. Finch SC. Landmark perspective: Acute radiation syndrome. *Jama* 1987; 258:664-7.
31. Zhang H, Yan H, Ying J, Du L, Zhang C, Yang Y, et al. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term immunosuppression in mice. *International journal of radiation biology* 2018; 94:28-36.
32. Martin R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux JJ, Sokol H, et al. The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflammatory bowel diseases* 2014; 20:417-30.
33. Siegmund B. Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? *Immunity* 2010; 32:300-2.
34. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 2010; 32:379-91.
35. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 2011; 145:745-57.
36. Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal immunology* 2011; 4:31-42.
37. Saha S, Aranda E, Hayakawa Y, Bhanja P, Atay S, Brodin NP, et al. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nature communications* 2016; 7:13096.
38. Liu YG, Chen JK, Zhang ZT, Ma XJ, Chen YC, Du XM, et al. NLRP3 inflammasome activation mediates radiation-induced pyroptosis in bone marrow-derived macrophages. *Cell death & disease* 2017; 8:e2579.
39. May R, Qu D, Weygant N, Chandrakesan P, Ali N, Lightfoot SA, et al. Brief report: *Dcl1* deletion in tuft cells results in impaired epithelial repair after radiation injury. *Stem Cells* 2014; 32:822-7.
40. Chandrakesan P, May R, Weygant N, Qu D, Berry WL, Sureban SM, et al. Intestinal tuft cells regulate the ATM mediated DNA Damage response via *Dcl1* dependent mechanism for crypt restitution following radiation injury. *Scientific reports* 2016; 6:37667.
41. Howitt MR, Lavoie S, Michaud M, Blum AM, Tran SV, Weinstock JV, et al. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 2016; 351:1329-33.
42. Dorr W. Radiobiology of tissue reactions. *Annals of the ICRP* 2015; 44:58-68.

Effet de l'administration de *F. prausnitzii* sur l'ulcération colorectale radio-induite

Introduction :

L'étude de l'utilisation de probiotiques en clinique et pré-clinique pour limiter l'apparition des effets secondaires de la radiothérapie pelvienne se développe ces dernières années et montre une efficacité thérapeutique certaine. *F. prausnitzii* est une bactérie anaérobie retrouvée en grande quantité dans le côlon humain et qui joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie de cet organe. Plusieurs études ont montré sa capacité à réduire les atteintes observées dans des modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires intestinales¹⁹⁸⁻²⁰⁶. Ces résultats, associés à ceux montrant sa diminution chez les patients traités par radiothérapie pelvienne¹²⁹, nous ont amené à envisager une stratégie de traitement basée sur sa réintroduction dans l'organisme pour retrouver les fonctions qu'elle possède dans le côlon. Dans le premier article, soumis dans le journal « Gut Microbes », nous avons montré l'intérêt d'administrer *F. prausnitzii* pour prévenir le développement de lésions aiguës dans un modèle d'atteintes colorectales radio-induites. En effet, nous avons pu observer que l'administration de *F. prausnitzii* possède des effets bénéfiques significatifs à court terme sur la structure et la fonctionnalité du côlon, en maintenant l'intégrité de la barrière épithéliale colique. L'administration de *F. prausnitzii* permet de diminuer le développement des lésions coliques observées trois jours après irradiation, correspondant à une atypie des cryptes coliques, et sept jours après irradiation, correspondant à une ulcération de la muqueuse colique. A la suite de ces résultats, nous nous sommes interrogés sur la pérennité de l'effet de son administration à plus long terme. Quatre semaines après irradiation, nous observons une ulcération lésion sévère sub-aigüe, similaire à celle qui est décrite chez les patients traités par radiothérapie pour des cancers de la prostate et ayant reçu par accident un surdosage d'irradiation (accident de sur-irradiation d'Epinal par exemple). L'administration de *F. prausnitzii* permet-elle de réduire le développement de ce type de lésion à long terme ? Pour répondre à cette question, nous avons évalué l'effet de *F. prausnitzii* sur les lésions coliques radio-induites obtenues 4 semaines après irradiation colorectale en appliquant différentes modalités d'administration à long terme. Les articles de la littérature étudiant l'effet de l'administration de probiotiques effectuent généralement des gavages pendant 3 à 10 jours consécutifs, en fonction des études. Nous avons donc dû établir nos propres protocoles d'administration pour étudier l'effet d'un traitement par *F. prausnitzii* jusqu'à 4 semaines après irradiation.

Matériel et méthodes :

Les informations relatives à l'aspect éthique, aux animaux utilisés, à la souche bactérienne administrée et au protocole d'irradiation effectué durant ces expérimentations sont similaires à celles décrites dans l'article.

*Protocole d'irradiation et protocoles d'administration de *F. prausnitzii**

En fonction du protocole, 3 ou 7 jours avant l'irradiation, 1.10^9 CFU de *F. prausnitzii* ou un volume équivalent de PBS est administré par voie intra-gastrique chaque jour, de façon à prévenir le développement des lésions coliques en protégeant le tissu. Après irradiation, plusieurs protocoles d'administration, représentant un traitement curatif, ont été effectués :

- Protocole 1 : Gavage tous les jours, début 3 jours avant irradiation et fin 4 semaines après irradiation (Figure 1, A)
- Protocole 2 : Gavage 3 jours avant irradiation et 3 jours après irradiation tous les jours, puis 3 fois par semaine (1 jour sur 2) jusqu'à euthanasie, 4 semaines après irradiation (Figure 1, B)
- Protocole 3 : Gavage 7 jours avant irradiation et 3 jours après irradiation tous les jours, puis 2 fois par semaine jusqu'à euthanasie, 4 semaines après irradiation (Figure 1, C)
- Protocole 4 : Gavage 7 jours avant irradiation et 3 jours après irradiation tous les jours, puis une fois par semaine jusqu'à euthanasie, 4 semaines après irradiation (Figure 1, D)
- Protocole 5 : Gavage 7 jours avant irradiation et 3 jours après irradiation tous les jours, puis arrêt des gavages jusqu'à euthanasie, 4 semaines après irradiation (Figure 1, E)

Les groupes d'études sont comme suit : Rats contrôles non-irradié et traités par PBS (Ctrl PBS), rats contrôles irradiés et traités par PBS (IRR PBS) et rats irradiés et traités par *F. prausnitzii* (IRR Fprau).

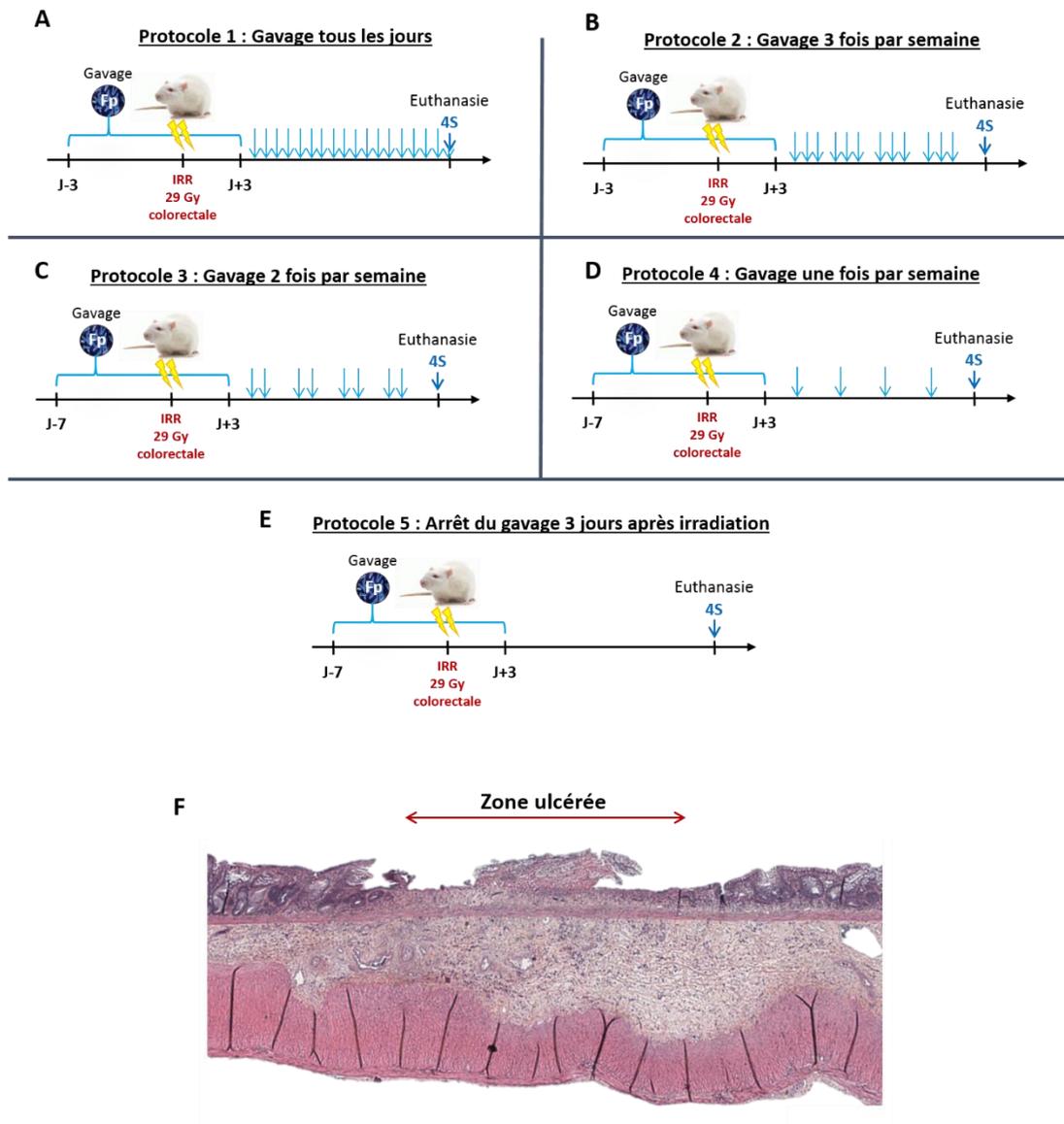


Figure 1 : (A-E) Représentations schématiques des cinq protocoles d’administration de *F. prausnitzii* étudiés, l’administration quotidienne de *F. prausnitzii* débute 3 ou 7 jours avant irradiation puis jusqu’à 3 jours après irradiation. Après 3 jours, la fréquence d’administration varie en fonction du protocole, jusqu’à l’euthanasie des animaux, 4 semaines (4S) après irradiation **(F)** Schématisation de la zone d’ulcération mesurée lors de l’analyse de l’effet de l’administration de *F. prausnitzii* sur la taille de l’ulcération.

Histologie et mesure de l’ulcération

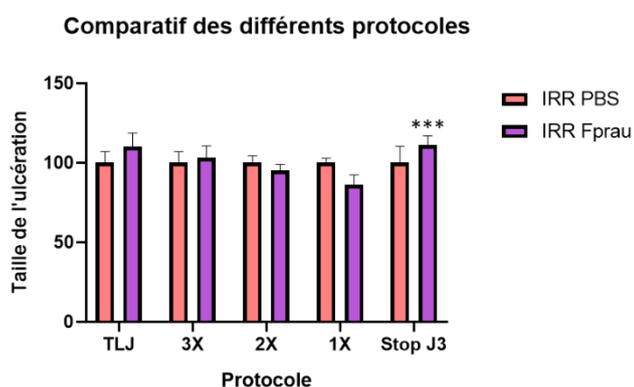
Les animaux ont été sacrifiés par inhalation létale d’isoflurane, leur côlon distal a été prélevé, découpé dans la longueur, fixé avec 4% de formaldéhyde et inclus en paraffine. Les côlons inclus en paraffine ont été coupés grâce à un microtome manuel (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) en lames longitudinales de 5 μ m, en 5 séries distinctes espacées de 250 μ m et colorées par hématoxyline-éosine-safran (HES). La lésion de chaque lame a été mesurée

par microscopie grâce au logiciel Histolab (Microvision Instruments, Lisses, France) (Figure 1, F).

Résultats :

*Comparaison de l'effet observé de l'administration de *F. prausnitzii* sur les différents protocoles*

Nous avons commencé les expérimentations par le protocole où l'administration est effectuée quotidiennement jusqu'à l'euthanasie des animaux (protocole 1), puis nous avons diminué au fur et à mesure le nombre d'administrations. Le paramètre analysé dans cette expérience a été la taille de l'ulcération. Selon le protocole effectué, les animaux irradiés non traités possèdent une ulcération colique comprise entre 4385 μ m et 6396 μ m (Figure 2, A,B). Nous avons observé que, plus nous diminuons le nombre d'administration, plus la taille de l'ulcère a tendance à diminuer, cependant cette observation n'est pas significative. Ainsi, nos résultats montrent que l'administration de *F. prausnitzii* une fois par semaine (protocole 4) présente le meilleur effet parmi les différents protocoles expérimentés, même si cet effet reste très modéré et non significatif. En effet, nous avons observé pour ce protocole une diminution non significative de 13% de la taille de l'ulcération chez les animaux traités par *F. prausnitzii* par rapport aux animaux irradiés non traités. Nous avons également observé que, lorsque les administrations de *F. prausnitzii* sont arrêtées 3 jours après irradiation, l'ulcération augmente significativement de 11% par rapport aux animaux irradiés non traités.

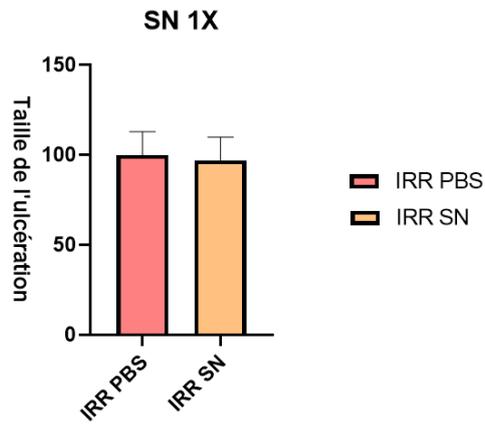
A**B**

| Protocole | Taille moyenne lésion IRR PBS (µm) | Taille moyenne lésion IRR Fprau (µm) | Comparaison Fprau VS PBS | Significativité |
|----------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Tous les jours | 4385 | 4831 | +10% | NS |
| 3X/semaine | 4385 | 4557 | +4% | NS |
| 2X/semaine | 5156 | 4920 | -4% | NS |
| 1X/semaine | 6396 | 5554 | -13% | NS |
| Stop J3 | 4696 | 5241 | +11% | 0,001 |

Figure 2 : Etude de l'effet des différents protocoles d'administration de *F. prausnitzii* à long terme sur la taille de l'ulcération colorectale chronique radio-induite. **(A)** Quantification de la taille de l'ulcération colique radio-induite pour les cinq protocoles étudiés. **(B)** Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour chaque protocole. TLJ=Tous les jours, IRR = Irradié, Fprau=*F. prausnitzii*, ***= $p < 0.001$ VS IRR PBS

Effet du gavage avec le surnageant de F. prausnitzii avec le protocole 4

Notre recherche d'amélioration du bénéfice thérapeutique de *F. prausnitzii* observé avec le protocole 4 nous a conduit à étudier l'effet de l'administration du surnageant de culture de *F. prausnitzii* avec ce même protocole (Figure 3). Ce type de traitement nous permet d'analyser si les métabolites sécrétés par *F. prausnitzii* sont capables d'agir sur la taille de l'ulcération colique radio-induite, tout en nous affranchissant de l'administration de la bactérie en elle-même, dont la présence sur une barrière épithéliale ouverte pourrait être néfaste. Néanmoins, nous avons observé que ce traitement n'a pas permis de diminuer significativement la taille de l'ulcération colorectale tardive radio-induite 4 semaines après irradiation.



| Protocole | Taille moyenne lésion IRR PBS (µm) | Taille moyenne lésion IRR SN (µm) | Comparaison SN VS PBS | Significativité |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 1X/semaine SN | 6396 | 6207 | -2% | NS |

Figure 3 : Quantification de la taille de l'ulcération colique radio-induite. Protocole 4 : Etude de l'effet de l'administration de surnageant de culture de *F. prausnitzii*. SN=Surnageant ; IRR=Irradié

Discussion :

Avec ces expérimentations, nous avons voulu approfondir l'étude de l'effet de *F. prausnitzii* sur les lésions colorectales radio-induites, cette fois-ci à long terme, sur une ulcération tardive 4 semaines après irradiation. Il semble que notre étude soit la première à analyser l'effet d'un probiotique sur la prévention de lésions colorectales tardives radio-induites²⁵⁰.

Notre premier article montre une action de *F. prausnitzii* sur des lésions colorectales radio-induites observées à court terme après irradiation, sur le plan structural et fonctionnel. Nous montrons par ces nouvelles expériences que cette action n'est pas pérenne sur des atteintes plus tardives. En effet, les résultats que nous avons obtenus ne montrent aucune efficacité thérapeutique de l'administration de *F. prausnitzii* sur ce type de lésion, quel que soit le protocole utilisé (Figure 4).

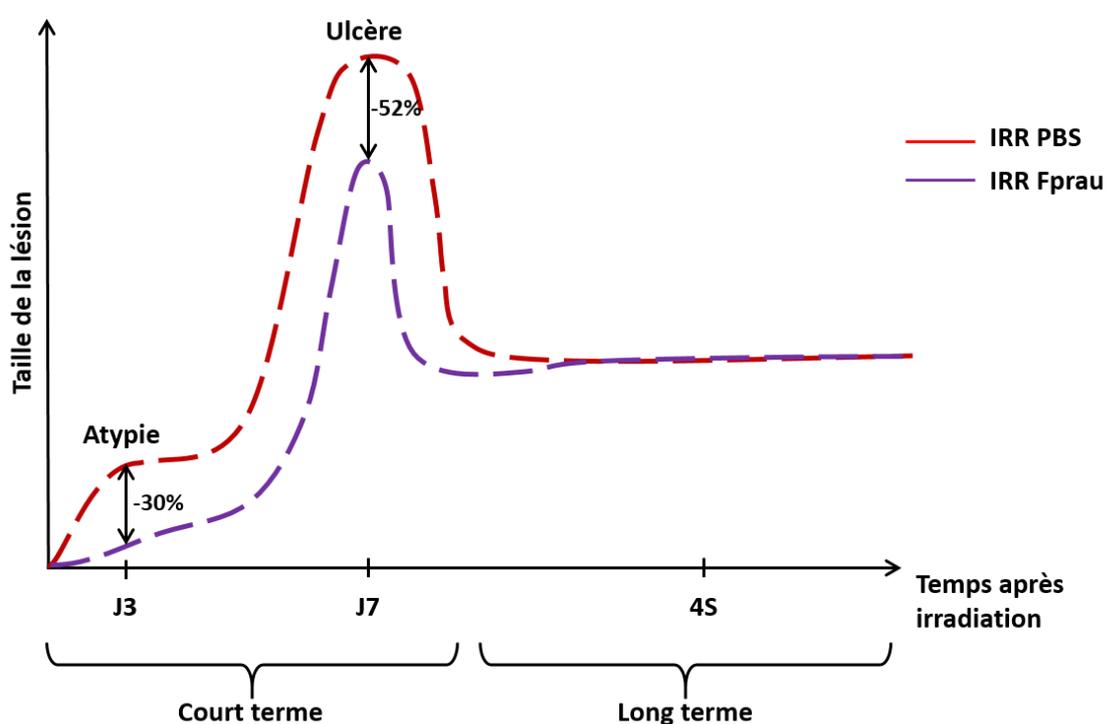


Figure 4 : Représentation schématique des effets de l'administration de *F. prausnitzii* sur les lésions colorectales radio-induites observées au cours du temps.

L'effet bénéfique maximal est observé avec le protocole d'administration une fois par semaine après irradiation, mais cet effet est très faible et non significatif puisque l'ulcération reste importante et non régénérante. L'ulcération obtenue 4 semaines après irradiation constitue

une ouverture totale de la barrière épithéliale. Bien que *F. prausnitzii* possède de nombreux avantages thérapeutiques, il est peu probable qu'elle puisse à elle seule empêcher l'établissement de cette ulcération sévère. Nous avons vu dans notre étude sur l'administration de *F. prausnitzii* sur les atteintes colorectales aiguës, que cette bactérie semble capable d'activer l'inflammasome en condition d'irradiation. L'activation de l'inflammasome par *F. prausnitzii* à long terme, associée à l'inflammation excessive induite par l'irradiation, pourrait conduire à l'aggravation de l'atteinte épithéliale colique³³. Comme expliqué dans l'introduction (page 47), l'activation du NLRP dans les cellules épithéliales est importante pour le processus de réparation du tissu. Lorsque cet inflammasome est activé dans les cellules immunitaires, notamment les macrophages, et que cette activation est maintenue dans le temps, ces cellules adoptent un profil pro-inflammatoire, ce qui provoque une aggravation de la lésion. L'étude de l'activation de l'inflammasome, par marquage immunohistochimique de l'IL-18 ou des caspases impliquées dans l'inflammasome par exemple, dans notre modèle de lésions colorectales tardives radio-induites nous permettrait d'évaluer la localisation (cellules épithéliales ou immunitaires) et le taux de cette activation. L'inhibition de l'inflammasome, par des inhibiteurs spécifiques, nous permettrait également d'évaluer si l'inflammasome est impliqué dans la perte du bénéfice thérapeutique apporté par l'administration de *F. prausnitzii*. Ces données supplémentaires nous permettraient de comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans l'inefficacité thérapeutique de l'administration de *F. prausnitzii* sur des atteintes tardives et nous aideraient à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour potentialiser ce traitement.

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'arrêt des administrations 3 jours après irradiation suggèrent que la fréquence des administrations est une variable importante et que l'arrêt du traitement après irradiation ne permet pas d'augmenter le bénéfice thérapeutique apporté par l'administration de *F. prausnitzii* à long terme. Notre hypothèse pour expliquer cette observation serait qu'un équilibre s'établirait durant l'administration à long terme de *F. prausnitzii* en condition d'irradiation colorectale. Premièrement, la sécrétion de métabolites par *F. prausnitzii*, dont les propriétés anti-inflammatoires ont été observées dans des modèles expérimentaux d'inflammation colique, permet d'atténuer l'inflammation liée à l'irradiation. Deuxièmement, l'activation chronique de l'inflammasome par *F. prausnitzii* pourrait provoquer une aggravation de l'inflammation radio-induite. Ainsi, un équilibre entre effet anti-inflammatoire et pro-inflammatoire de *F. prausnitzii* à long terme pourrait se créer et la fréquence d'administration influencerait cet équilibre. Une trop grande fréquence

d'administration induirait une activation chronique de l'inflammasome, aggravant l'inflammation radio-induite. Les métabolites sécrétés par *F. prausnitzii* seraient alors inefficaces pour stabiliser l'inflammation. A l'inverse, l'arrêt de l'administration de *F. prausnitzii* après irradiation pourrait provoquer l'activation de l'inflammasome, qui serait alors potentiellement maintenue dans le temps et les métabolites anti-inflammatoires de *F. prausnitzii*, absents par manque d'administration, ne pourraient donc pas contrer cet effet inflammatoire. Cette réflexion sur l'importance de la fréquence d'administration de *F. prausnitzii* apporte un nouvel élément dans la recherche de la modalité de traitement optimale et indique que des recherches supplémentaires sont nécessaires pour établir une méthode de traitement adéquate pour observer le meilleur bénéfice thérapeutique de *F. prausnitzii*.

Dans l'optique d'améliorer l'effet observé avec le protocole d'administration une fois par semaine après irradiation, nous avons réitéré l'expérience avec du surnageant de culture de *F. prausnitzii*. En effet, en gardant uniquement les métabolites sécrétés par *F. prausnitzii*, nous éliminons les effets induits par la bactérie elle-même, pouvant être potentiellement néfaste en administration à long terme. Plusieurs études pré-cliniques ont montré que ce type de traitement induit un effet thérapeutique, parfois supérieur à la bactérie elle-même, dans des modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires intestinales. Cependant, dans nos conditions expérimentales, l'étude de l'effet de l'administration du surnageant n'a pas montré de diminution de l'atteinte colorectale chronique radio-induite. L'absence de bénéfice thérapeutique par cette méthode nous amène à penser que la concentration du surnageant de culture de *F. prausnitzii* administré serait insuffisante, la quantité de métabolites serait alors trop faible pour induire un effet bénéfique. La quantité de métabolites apportée par l'administration est une variable importante et doit donc être prise en compte dans l'élaboration de la stratégie thérapeutique.

La technique d'administration est également un élément important dans l'étude de l'effet d'un traitement et doit être choisie judicieusement. Le gavage intra-gastrique est la technique expérimentale la plus utilisée pour administrer un traitement par probiotique. Cette méthode permet de contrôler la quantité ingérée par l'animal et la fréquence de prise du traitement. Cependant, le gavage à long terme, dans le cas présent pendant 4 semaines, peut constituer un biais sur les animaux et pourrait expliquer les résultats obtenus avec l'administration chronique de *F. prausnitzii* dans notre modèle. En effet, l'utilisation de sonde rigide en inox pour effectuer des gavages intra-gastriques répétés peut entraîner une irritation de

l'œsophage des rats, induisant une inflammation à l'origine d'une douleur. Il est possible que le gavage intra-gastrique chronique puisse créer un stress lié à la douleur, notamment durant les protocoles d'administration où nous traitons les rats plusieurs fois par semaine. Ainsi, une autre technique d'administration, comme l'instillation intra-rectale, pourrait être envisagée afin de diminuer le stress lié à la douleur de l'irritation de l'œsophage des animaux et d'éviter les biais occasionnés par ce stress.

En conclusion de ces résultats, il semble que l'usage de *F. prausnitzii* en tant que traitement préventif soit efficace dans la prévention des atteintes aiguës colorectales radio-induites, mais que, dans le cas d'atteintes à plus long terme, d'autres études soient nécessaires pour établir un protocole de traitement adéquat. L'irradiation pratiquée dans notre modèle est forte et induit systématiquement l'apparition d'une lésion tardive profonde, étendue et non régénérante. Cette lésion peut être comparée à celle retrouvée chez les patients sévèrement atteints, notamment en condition d'irradiation accidentelle ou de surexposition aux rayonnements ionisants. Les altérations aiguës obtenues dans notre modèle s'apparentent aux altérations aiguës coliques observées chez le patient durant la radiothérapie pelvienne, même si notre protocole d'irradiation n'est pas similaire à celui utilisé en clinique. De ce fait, si *F. prausnitzii* est capable de protéger la barrière colique dans ces conditions d'irradiation, où la dose délivrée est forte et induit une atteinte sévère, on peut penser que son efficacité dans un protocole clinique de radiothérapie, avec un fractionnement de la dose, serait très bénéfique. Ainsi, l'administration de *F. prausnitzii* avant la radiothérapie permettrait de diminuer les symptômes aigus, ce qui améliorerait la qualité de vie du patient. Ce traitement aiderait donc au maintien de la radiothérapie, qui, dans le cas de symptômes aigus trop sévères, doit parfois être stoppée temporairement ou modulée, compromettant l'efficacité du contrôle tumoral.

La comparaison de plusieurs modalités d'administration de *F. prausnitzii* que nous avons effectué apporte des données supplémentaires sur l'importance des méthodes et des variables impliquées dans le protocole de traitement par *F. prausnitzii* et de manière plus générale, par des probiotiques. Les résultats que nous avons obtenus soulignent les limites de nos méthodes expérimentales mais mettent également en évidence la complexité des mécanismes induits par l'administration à long terme de *F. prausnitzii*. Ces mécanismes sont influencés par différentes variables associées à la modalité d'administration. La fréquence des administrations, la technique d'administration utilisée et la quantité de bactéries et/ou de métabolites apportée sont des facteurs primordiaux à prendre en compte dans la conception

d'une stratégie thérapeutique impliquant des probiotiques. Il est donc nécessaire d'approfondir les recherches sur la corrélation entre les mécanismes induit par la bactérie et les variables liées à la modalité d'administration pour établir un protocole thérapeutique par *F. prausnitzii* optimal et sans risque pour le patient.

**Effet de l'association de *F. prausnitzii* et de la
thérapie par cellules stromales
mésenchymateuses sur le développement
d'ulcération colorectale radio-induite**

Introduction :

Nous avons observé que l'administration de *F. prausnitzii* dans un modèle expérimental de lésions colorectales radio-induites permet de diminuer la taille de l'ulcération observée 7 jours après irradiation. Cette atteinte représente le début de l'établissement de l'ulcération et évoluera par la suite vers une ulcération tardive établie et non régénérante. Agir sur le développement de cette lésion permettrait donc de réduire l'ulcération chronique. Bien que l'administration de *F. prausnitzii* montre un effet significatif sur la taille de la lésion, une ulcération subsiste, indiquant une efficacité incomplète de *F. prausnitzii* sur la prévention de l'apparition de la lésion. Dans l'optique d'améliorer l'efficacité thérapeutique partielle de *F. prausnitzii* sur ces atteintes colorectales à court terme et de permettre de réduire ou d'empêcher totalement le développement de l'ulcère, nous lui avons associé une thérapie cellulaire par cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Les CSM sont capables d'induire la protection/régénération de lésions, notamment de lésions intestinales et coliques, grâce aux multiples propriétés biologiques qu'elles possèdent. Premièrement, ces cellules sont capables de migrer vers la zone lésée après leur injection dans le système sanguin, leur permettant de se diriger vers des lésions diffuses ou difficiles d'accès. Deuxièmement, leur action trophique par la sécrétion de molécules, aux propriétés anti-apoptotiques, anti-oxydantes, pro-prolifératives, pro-angiogéniques et anti-fibrosantes, leur permet de diminuer les lésions tissulaires. Enfin, la régulation de l'inflammation est un effet reconnu des CSM, qui peuvent agir sur le système immunitaire inné et adaptatif. En effet, des études pré-cliniques *in vivo* et *in vitro* ont permis d'observer une régulation de l'activation, la prolifération, la maturation, la production de cytokines et d'autres fonctionnalités des cellules immunitaires par les CSM. Le traitement des lésions intestinales et colorectales radio-induites par l'injection de CSM est efficace dans la régénération des muqueuses lésées (voir Annexe 2 : Traitement de la PRD par thérapie cellulaire). Cependant, comme pour l'administration de *F. prausnitzii*, les CSM ont un effet partiel sur des lésions colorectales tardives radio-induites. Dans la mesure où *F. prausnitzii* et les CSM agiraient par des mécanismes différents, l'association de ces deux traitements pourrait permettre une action synergique ou complémentaire de leurs effets bénéfiques. Ainsi, l'association de ces deux types de thérapie pourrait permettre de protéger du développement de l'ulcération colorectale radio-induite observée à court terme, 7 jours après irradiation.

Matériel et méthodes :

Les informations relatives à l'aspect éthique, aux animaux utilisés, à la souche bactérienne administrée, au protocole d'irradiation, aux marquages immunohistochimiques réalisés et à l'analyse du microbiote fécal effectué durant ces expérimentations sont similaires à celles décrites dans notre premier article.

Culture cellulaire, caractérisation et protocole d'administration

Du tissu adipeux sous-cutané a été récupéré chez des rats SD, découpé finement et digéré par action enzymatique à 37°C dans un milieu MEM α contenant 0.5% de collagénase type 1 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) durant 30 minutes à trois reprises. Le tissu digéré a par la suite été filtré à travers un filtre de 100 μ m. La collagénase a ensuite été neutralisée par ajout d'un milieu de culture contenant 10% de SVF. Après centrifugation (1200rpm, 7min), le culot de cellules est resuspendu dans un milieu MEM α contenant 20% de SVF, de la pénicilline, de la streptomycine et de la L-glutamine (Invitrogen), puis les cellules sontensemencées à 1000 cellules/cm² et mise en culture à 37°C, 5% CO₂. Une semaine plus tard, le jour de l'injection, les cellules sont trypsinées et lavées en PBS trois fois avant leur injection. Le phénotype des CSM adipeuses amplifiées a été vérifié par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules CD90- et CD106- a été analysé et l'absence de cellules de lignée hématopoïétique a été vérifiée avec les marqueurs CD34 et CD45. Les animaux ont reçu 5.10⁶ CSM adipeuses ou un volume équivalent de PBS dans la veine de la queue directement après irradiation.

*Protocole d'administration de *F. prausnitzii**

Trois jours avant l'irradiation, 1.10⁹ CFU de *F. prausnitzii* ou un volume équivalent de PBS est administré par voie intra-gastrique chaque jour, jusqu'à 3 jours après irradiation. L'euthanasie des animaux a lieu 7 jours après irradiation (Figure 1, A).

Les 5 groupes d'études sont les suivants : Rats contrôles non-irradié et traités par PBS (Ctrl PBS), rats contrôles irradiés et non traités (IRR PBS), rats irradiés et traités par CSM (IRR CSM), rats irradiés et traités par *F. prausnitzii* (IRR Fprau) et rats irradiés et traités par *F. prausnitzii* et CSM (IRR Fprau CSM). Chaque groupe comporte entre 8 et 12 animaux.

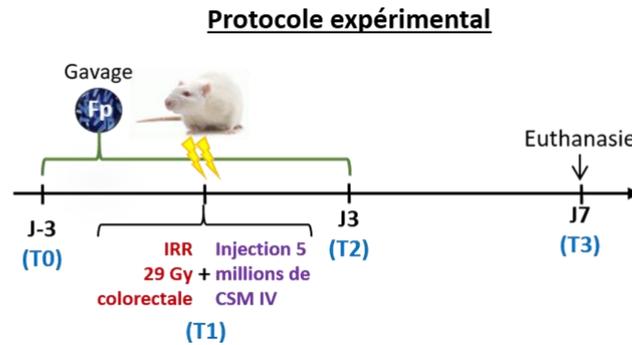
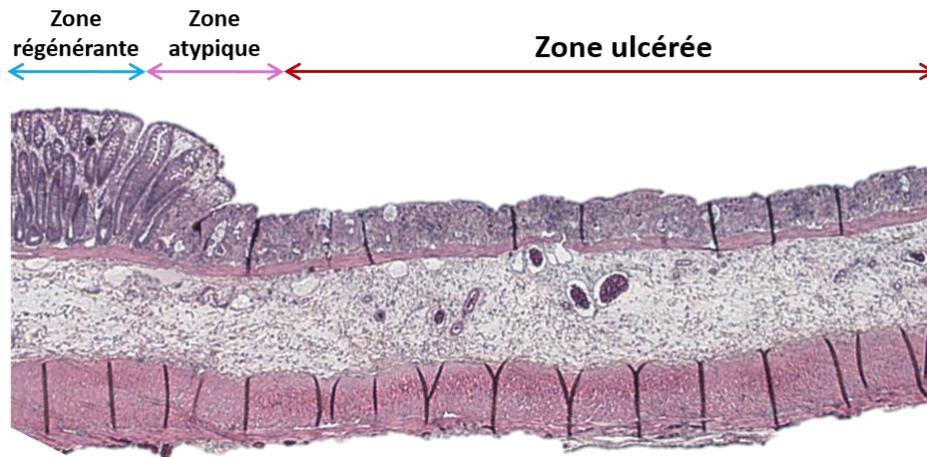
A**B**

Figure 1 : Explications du protocole expérimental et de la technique de mesure d’ulcère (A)
Schéma représentatif du protocole suivi lors de cette étude **(B)** Différenciation des zones observées sur une lésion colorectale radio-induite 7 jours après irradiation. La taille de l’ulcération correspond à la mesure de la zone ulcérée.

Histologie et mesure de l’ulcération

Les animaux ont été sacrifiés par inhalation létale d’isoflurane, leur côlon distal a été prélevé, découpé dans la longueur, fixé avec 4% de formaldéhyde et inclus sur la tranche en paraffine. Les côlons inclus en paraffine ont été coupés grâce à un microtome manuel (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) en lames longitudinales de 5 μm , en 5 séries distinctes espacées de 250 μm et colorées par hématoxyline-éosine-safran (HES). La lésion de chaque lame a été mesurée par microscopie grâce au logiciel Histolab (Microvision Instruments, Lisses, France). Nous avons réparti les animaux de chaque groupe en trois sous-groupes, selon la taille de leur lésion, afin de mieux observer l’efficacité thérapeutique des traitements. Le sous-groupe « lésion faible » regroupe les animaux possédant une ulcération inférieure à 2000 μm , le sous-groupe « lésion modérée », les animaux possédant une ulcération comprise

entre 2000 μ m et 6000 μ m, et le sous-groupe « lésion forte », les animaux possédant une ulcération supérieure à 6000 μ m.

Résultats :

Effet des traitements sur la taille de l'ulcération colorectale radio-induite

La mesure de la lésion par analyse histologique pour chaque groupe a montré des différences entre les groupes sur la taille de lésion. Nous avons étudié la répartition des ulcérations en fonction de leur taille pour chaque groupe (Figure 2, A,C). Le groupe d'animaux irradiés possède une grande proportion d'animaux avec une ulcération forte ou modérée (87,5%). L'injection de CSM seule a permis d'obtenir une majorité d'animaux (87,5%) présentant des lésions considérées comme faibles, cette observation valide l'effet thérapeutique du traitement par CSM. L'administration seule de *F. prausnitzii* est le traitement induisant la plus forte hétérogénéité dans la répartition de la taille d'ulcération parmi les groupes. En effet, ce groupe induit une répartition équivalente d'animaux dans chaque catégorie : faiblement atteints (50%), atteinte modérée ou forte (50%). Il semble donc que l'administration de *F. prausnitzii* soit bénéfique pour une proportion d'animaux traités. Enfin, le groupe d'animaux ayant reçu les deux traitements associés, *F. prausnitzii* et CSM, montrent un nombre important d'animaux (67%) avec une faible taille de lésion, mais 33% des ulcérations mesurées montrent une taille de lésion importante. En excluant les animaux ne possédant pas d'ulcère colique, nous avons mesuré la taille de la lésion chez les différents groupes traités (Figure 2, B,C). Les animaux irradiés non traités présentent la mesure d'ulcération la plus grande parmi les quatre groupes avec une ulcération moyenne de 6919 \pm 729 μ m. Le traitement par injection seule de CSM a permis de réduire significativement la taille de l'ulcération (66%, $p < 0.001$) par rapport aux animaux irradiés non traités. Ce traitement possède l'effet bénéfique le plus important parmi tous les groupes d'animaux traités avec une ulcération moyenne de 2303 \pm 720 μ m. L'administration de *F. prausnitzii* induit une diminution significative de la taille d'ulcération colorectale, qui mesure en moyenne 4325 \pm 686 μ m pour ce groupe. La taille de l'ulcération diminue de 37% ($p < 0.01$) par rapport aux animaux irradiés non traités. Le traitement par association de *F. prausnitzii* et des CSM n'a apporté aucun bénéfice thérapeutique sur la taille de l'ulcération colorectale en comparaison avec la lésion observée chez les irradiés contrôles, avec une ulcération moyenne mesurée à 6582 \pm 1013 μ m chez les

animaux traités. Nous n’observons donc aucun effet synergique ou complémentaire de la co-administration des deux traitements chez les animaux traités par *F. prausnitzii* et CSM parmi la proportion d’animaux de ce groupe présentant une ulcération.

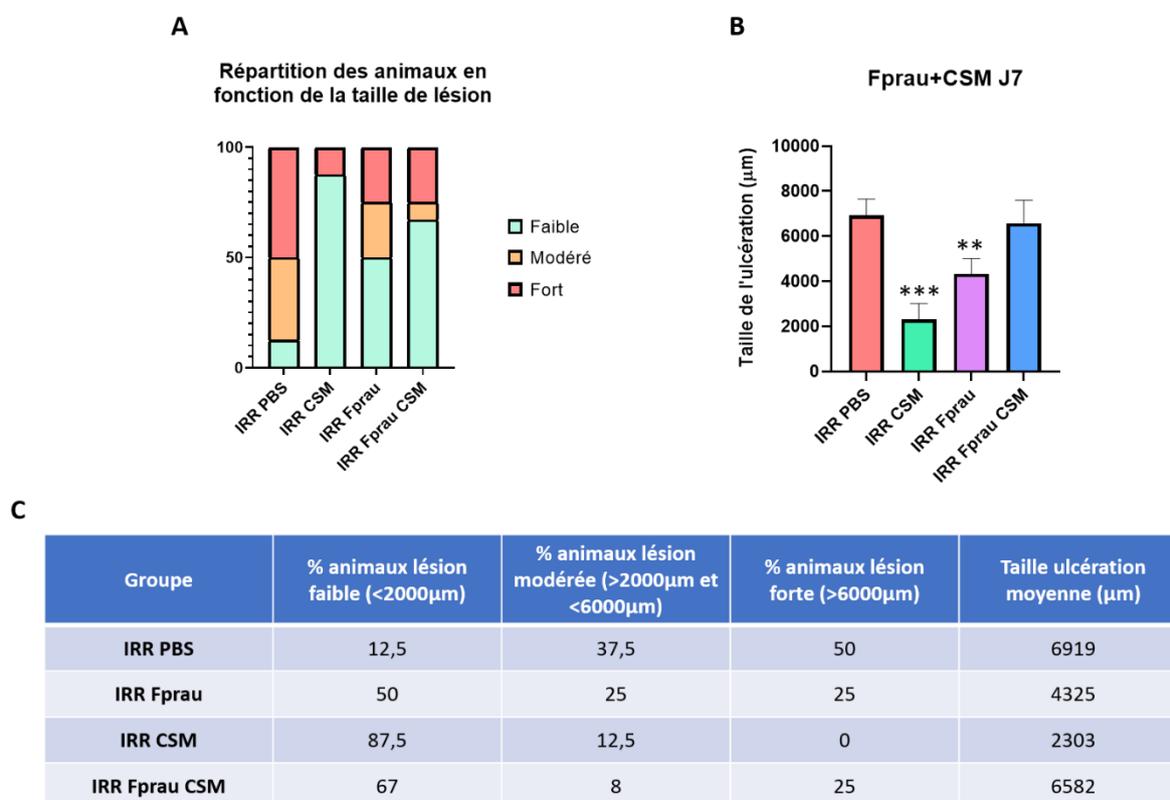


Figure 2 : Effet de l’administration des traitements sur le développement de l’ulcération colorectale radio-induite. (A) Mesure de la taille de l’ulcération colorectale radio-induite pour les différents types de traitement. **(B)** : Répartition des animaux en fonction de la taille de l’ulcération colorectale radio-induite. Lésion faible : <2000µm ; Lésion modérée : >2000µm et <6000µm ; Lésion forte : >6000µm. **(C)** Tableau récapitulatif des résultats obtenus par les différents traitements sur les lésions colorectales radio-induites observées. IRR=Irradié ; Fprau= *F. prausnitzii*. **p<0.01 ; ***p<0.001 vs IRR PBS.

Effet des traitements sur la capacité de régénération de l’ulcération colorectale radio-induite

Afin d’étudier la capacité de la muqueuse à régénérer l’ulcération colorectale observée 7 jours après irradiation, nous avons utilisé un marquage immunohistochimique anti-SOX9 (Figure 3, A). Ce marquage nous a permis d’analyser les populations de cellules souches et progénitrices dans la muqueuse, nécessaires au processus de réparation du tissu. La mesure des zones marquées par l’anticorps anti-SOX9 nous permet de comparer l’effet des différents

traitements sur le maintien de la population de cellules SOX9+ (Figure 3, B). Chez les animaux irradiés contrôles, 75.46% de l'ulcération totale présente des cryptes positives pour le marquage SOX9, représentant une zone qui évoluera, au fil du temps, vers une zone régénérante. Les groupes des animaux irradiés traités montrent chacun une augmentation de cette zone positive au marquage SOX9 par rapport aux irradiés non traités, avec 84.08%, 85.66% et 90.80% de l'ulcération totale marquée par SOX9 pour les groupes *F. prausnitzii*, *F. prausnitzii*+CSM et CSM respectivement. Il est nécessaire d'augmenter les effectifs afin de pouvoir procéder à l'analyse statistique de cette étude. Cependant, une tendance à l'augmentation se dessine pour le traitement par CSM et ces résultats semblent également confirmer l'absence de potentialisation de l'effet thérapeutique du traitement CSM par *F. prausnitzii*. Ainsi, le traitement par injection de CSM semble maintenir une population de cellules marquées SOX9 dans la zone lésée, illustrant la capacité des CSM à induire une meilleure régénération de la muqueuse colique. Le maintien de cette population cellulaire par les CSM pourrait expliquer le bénéfice thérapeutique important de cette thérapie dans le traitement de la lésion colorectale radio-induite observée 7 jours après irradiation.

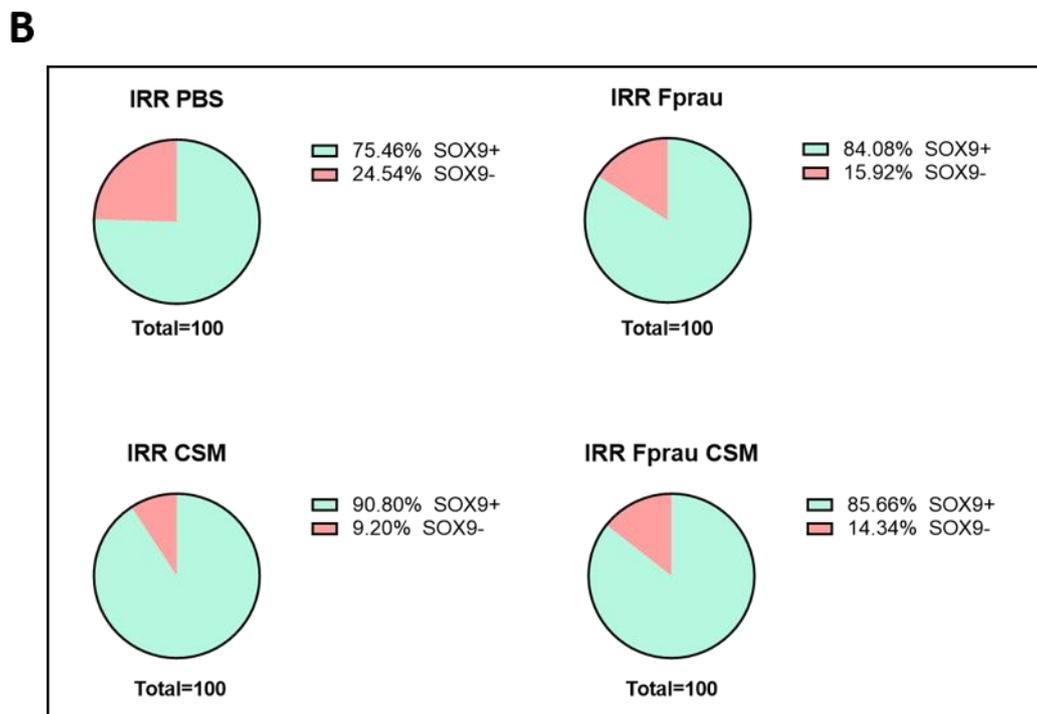
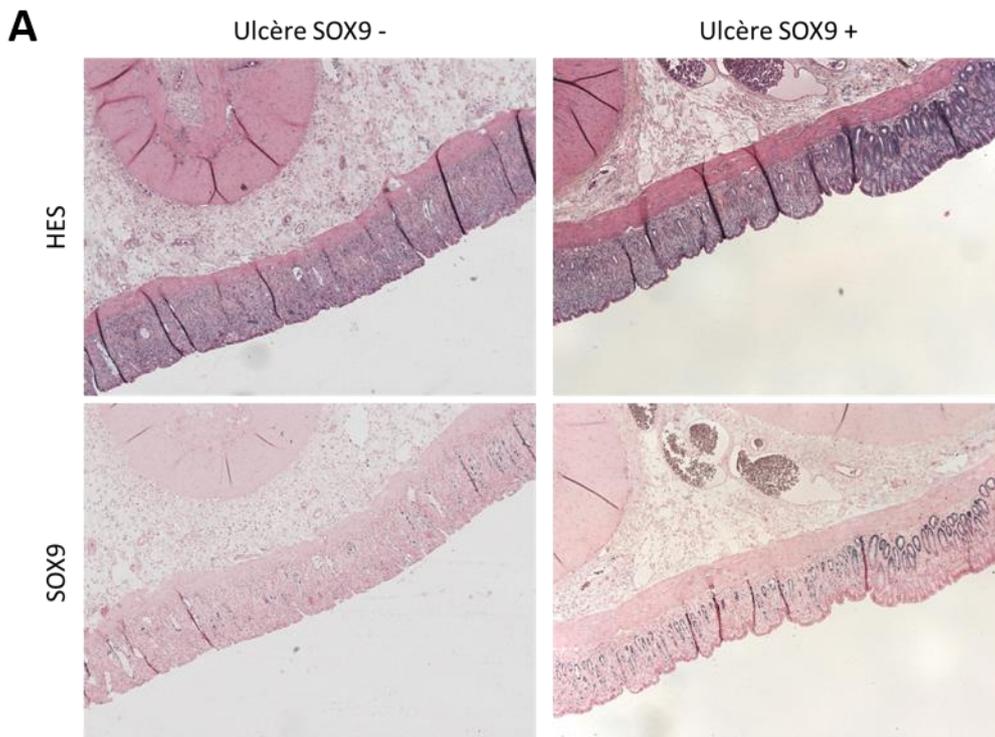


Figure 3 : Effet de l'administration des traitements sur la population de cellules souches et progénitrices SOX9+. (A) Coupe histologique représentant (photos du haut) une coloration HES de la lésion colorectale et (photos du bas) un marquage immunohistochimique anti-SOX9 de ces mêmes lésions. (B) Représentation graphique des deux zones observées dans l'ulcération, les zones SOX9+ et les zones SOX9-. IRR=Irradié ; Fprau= *F. prausnitzii*

Analyse de la composition du microbiote fécal 7 jours après irradiation et après traitement par CSM

Le traitement par CSM ayant montré le meilleur bénéfice thérapeutique parmi les traitements analysés, nous avons décidé d'effectuer une analyse du microbiote fécal de ce groupe afin d'étudier l'effet du traitement sur les populations bactériennes. Cette analyse nous permet d'évaluer si l'efficacité thérapeutique des CSM est associée à une modulation du microbiote fécal. En effet, notre objectif principal est de trouver un traitement efficace dans la prévention de l'apparition de lésions colorectales radio-induites, il est donc important de nous assurer que les différents niveaux d'altérations menant au développement de ces lésions soient modulés. La dysbiose étant un élément important dans l'apparition des atteintes coliques radio-induites, cette analyse nous permet d'évaluer si l'injection de CSM est capable d'empêcher cette dysbiose et d'identifier des méthodes de potentialisation si ce n'est pas le cas. Dans cette étude, trois groupes ont été comparés : Contrôle non irradié (Ctrl PBS), irradié non traité (IRR PBS) et irradié traité par CSM (IRR CSM). Une étude cinétique de la variation de la composition du microbiote a été effectuée grâce à des prélèvements à des temps différents : 3 jours avant irradiation (T0), jour de l'irradiation (et de l'injection de CSM pour le groupe traité) (T1), 3 jours après irradiation (T2) et 7 jours après irradiation (T3). L'alpha-diversité nous permet de quantifier le nombre d'espèces dans un échantillon, en prenant en compte l'abondance de chaque espèce. De manière globale, l'analyse de l'alpha-diversité par différents index indique que la diversité du microbiote ne varie pas entre les animaux contrôles, irradiés contrôles et irradiés traités par CSM (Figure 4, A). L'analyse de l'abondance relative des phyla bactériens nous permet de visualiser les variations dans les populations bactériennes appartenant aux phyla principaux. Les animaux irradiés non traités montrent une augmentation progressive non significative de l'abondance relative du phylum des Tenericutes (Figure 4, B), cette augmentation n'est pas observée chez les animaux irradiés et injectés avec les CSM. Une analyse de l'abondance relative des familles appartenant au phylum des Tenericutes montre que la famille des Anaeroplasmataceae augmente fortement dans trois échantillons de fèces sur les sept analysés, mais pas significativement, chez les animaux irradiés non traités et n'est pas retrouvée dans le groupe des animaux irradiés et traités par CSM (Figure 4, C).

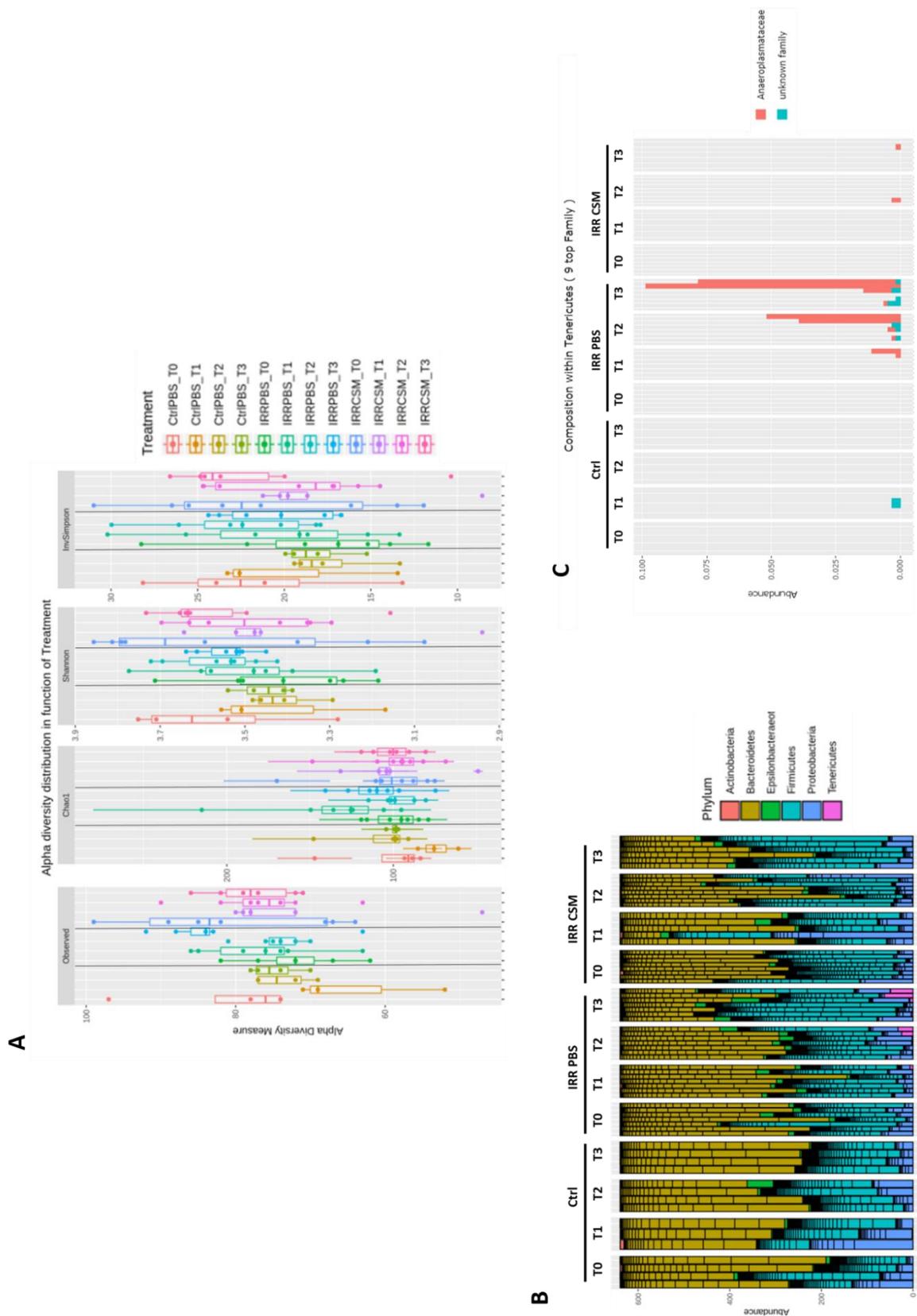


Figure 4 : Effet de l'administration de CSM sur le microbiote fécal 7 jours après irradiation colorectale de 29 Gy. L'analyse de la composition du microbiote a été effectuée sur des échantillons d'ARNr 16S extraits de fèces d'animaux contrôles (Ctrl PBS), irradiés (IRR PBS) et irradiés et injectés avec des CSM (IRR CSM). (Ctrl : n=4 ; IRR PBS et IRR CSM : n=8). **(A)** Alpha diversité avec index de diversité Observed, Chao1, Shannon et invSimpson. **(B)** Abondance relative des principaux phyla bactériens ; T0=3 jours avec irradiation ; T1=Jour de l'irradiation ; T2=3 jours après irradiation ; T3=7 jours après irradiation. **(C)** Abondance relative des familles principales appartenant au phylum des Tenericutes. Analyses statistiques effectuées par MANOVA. Ctrl=Contrôle ; IRR=Irradié.

Discussion :

Dans un premier temps, nous avons de nouveau observé un bénéfice thérapeutique de l'administration de *F. prausnitzii* sur la taille de l'ulcération. Dans un second temps, les CSM ont permis de protéger le tissu colique, en diminuant la taille de l'ulcération et en induisant une majorité d'animaux faiblement ulcérés. Elles ont également maintenu une population stable de cellules souches et progénitrices dans l'ulcération, ce qui permettrait une régénération de l'ulcération au fil du temps. Concernant le groupe traité par l'association de *F. prausnitzii* et des CSM ans ce groupe, lorsque nous avons observé la répartition des animaux en fonction de la taille de leur lésion, nous avons noté qu'une majorité d'animaux présente une faible ulcération ou pas d'ulcération. Cependant, ce traitement n'a induit aucun effet sur la taille de l'ulcération chez la proportion des animaux ulcérés. Il semble donc que l'association de *F. prausnitzii* et de l'injection de CSM ait induit un effet délétère chez les animaux qui possèdent une forte ulcération. Quelques études ont travaillé sur les interactions potentielles entre le microbiote et les cellules stromales intestinales, cependant l'association de probiotique à la thérapie cellulaire est un domaine peu étudié. Nous avons donc cherché à comprendre les résultats obtenus de l'association de *F. prausnitzii* et des CSM en établissant nos propres hypothèses.

Dans notre étude, les traitements par CSM seules et par *F. prausnitzii* seule ont induit un bénéfice thérapeutique significatif, ainsi nos résultats semblent indiquer que l'hypothèse de la mise en place d'un mécanisme néfaste impliquant les CSM et *F. prausnitzii* soit possible. Cette suggestion pourrait nous aider à expliquer pourquoi nous observons deux types de réponses au traitement dans le groupe des animaux traités par l'association des deux thérapies. La lésion observée chez les animaux traités par *F. prausnitzii* et CSM pourrait être une conséquence délétère de l'interaction entre les CSM et *F. prausnitzii*, et cette interaction néfaste pourrait ne pas avoir eu lieu chez les animaux ne présentant pas de lésion ou une taille de lésion faible.

Les CSM expriment des TLR et des NLR, leur permettant de détecter et de réagir à une grande variété de bactéries et de molécules bactériennes^{251,252}. Par conséquent, lors d'une thérapie par CSM pour traiter une inflammation intestinale, le microbiote contribue à la niche écologique des CSM greffées et participerait donc à la détermination du phénotype de la réponse des CSM, pro ou anti-inflammatoire (Figure 5). Les bactéries qui composent le microbiote sont capables d'interagir avec les CSM endogènes ou exogènes. On peut donc

penser que *F. prausnitzii*, dont la capacité à activer les TLR2 et 2/6 a été démontrée²³³, serait également en mesure d'interagir avec les CSM injectées lors d'une thérapie cellulaire.

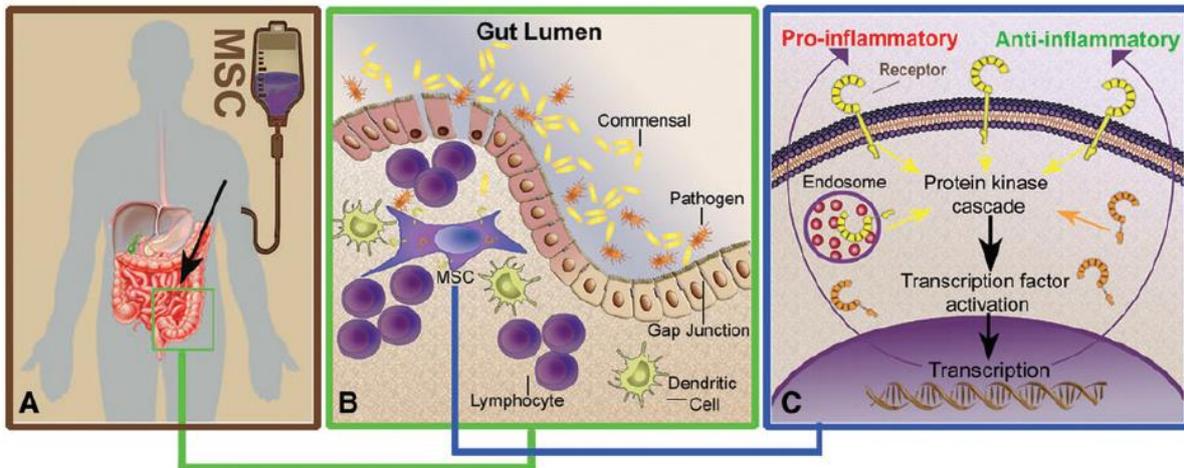


Figure 5 : Interactions du microbiote et des CSM injectées lors d'une thérapie cellulaire²⁵³

Notre premier article suggère que *F. prausnitzii* serait capable d'activer l'inflammasome à court terme après irradiation, par contact direct, grâce à un métabolite, à un ligand bactérien, ou à un autre composant bactérien. Certaines études décrivent que l'activation des TLR chez les CSM induit un changement vers un phénotype pro-inflammatoire²⁵⁴ et que l'activation d'inflammasomes par les TLR présents sur les CSM participe au processus d'inflammation. En effet, l'équipe de Chen *et al.* a montré que la stimulation de CSM de moelle osseuse par un signal bactérien (LPS, nigéricine) a induit l'activation des inflammasomes canonique (NLRP3) et non canonique (caspase 11) *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin²⁵⁵. L'activation de NLRP3 a notamment conduit à une pyroptose d'une partie de la population de CSM et à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 par les CSM survivantes. Nos résultats nous laissent donc penser que *F. prausnitzii* pourrait être capable d'activer l'inflammasome des CSM, induisant un changement vers un phénotype pro-inflammatoire des CSM. Ce mécanisme participerait donc à l'établissement d'une inflammation excessive dans la muqueuse colique et donc à l'aggravation de la lésion radio-induite. Une validation de cette hypothèse pourrait être apportée par quelques expériences supplémentaires. Une co-culture *in vitro* de CSM et de *F. prausnitzii* nous permettrait d'observer si des changements génétiques, phénotypiques ou sécrétoires apparaissent chez les CSM après avoir interagit avec la bactérie. Une analyse ELISA des cytokines de la muqueuse colique nous permettrait d'évaluer l'état inflammatoire du côlon, notamment les taux des cytokines IL-1 β et IL-18, après chaque traitement administré. L'étude de l'administration d'une molécule spécifique inhibitrice de l'activation de NLRP3 *in*

vivo, comme la dopamine, MCC950, CY-9 ou encore la molécule synthétisée par Chen *et al.*, nommée 66PR²⁵⁵, nous permettrait d'observer les effets de cette inhibition sur l'état de la lésion colorectale radio-induite après traitement par *F. prausnitzii* et CSM. De plus, cette technique nous permettrait également de mettre en évidence l'importance dans le mécanisme thérapeutique de l'activation de NLRP3 dans les cellules épithéliales par *F. prausnitzii*.

L'analyse préliminaire de l'évolution du microbiote a montré l'apparition d'une population appartenant au phylum des Tenericutes et à la famille des Anaeroplasmataceae chez les animaux irradiés non traités, qui débute dès 3 jours après l'irradiation et augmente jusqu'à 7 jours après irradiation. Ces résultats illustrent le début d'un changement du microbiote colique après irradiation. L'injection de CSM montre une tendance à diminuer l'abondance de cette population dans le microbiote, à 3 et 7 jours après irradiation. La famille des Anaeroplasmataceae est très peu documentée dans la littérature. Cette famille appartient à la classe des Mollicutes et à l'ordre des Anaeroplasmatales. L'ordre des Mycoplasmatales, appartenant également à cette classe, est beaucoup plus référencé dans des articles de recherches et est notamment associé à des pathologies inflammatoires intestinales^{256,257}. L'impact de la présence de la famille des Anaeroplasmataceae sur le développement des lésions colorectales radio-induites et le mécanisme mis en place par les CSM pour diminuer la population de cette famille dans le microbiote après irradiation restent encore à définir. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour compléter ces observations préliminaires et évaluer si ces changements sont significatifs. Peu de changements de population dans le microbiote sont observés après irradiation. Cette observation pourrait signifier qu'un autre type de changement aurait lieu dans le microbiote, dans sa fonctionnalité et non dans sa composition. En effet, la sécrétion de métabolites par les micro-organismes pourrait être altérée à court terme après irradiation colorectale. Une analyse métabolomique permettrait d'analyser si cette hypothèse est valable.

Les analyses supplémentaires évoquées durant cette discussion sont nécessaires pour comprendre pourquoi l'association de *F. prausnitzii* et des CSM induit, soit une forte régénération du tissu, soit un effet délétère annulant l'action thérapeutique des deux traitements et empêchant le processus de réparation de la muqueuse colique. A la suite de ces résultats, il semble que l'injection de CSM associées à un traitement par probiotique, dans le cas présent *F. prausnitzii*, puisse engendrer des effets néfastes dans les conditions d'administration que nous avons expérimentées. Nous devons donc réfléchir à une méthode

de potentialisation du traitement qui permettrait d'éviter ces effets. Cette méthode peut notamment se traduire par une administration de CSM ne pouvant pas devenir pro-inflammatoires, en inhibant l'activation de leur inflammasome par exemple, comme le proposent Chen *et al.* en conclusion de leurs résultats sur les conséquences de l'activation de l'inflammasome chez les CSM.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Avant-propos

La radiothérapie est l'un des traitements de référence pour la prise en charge des cancers localisés dans la région pelvienne. Bien que cette technique de traitement permette un bon contrôle tumoral, les rayonnements ionisants utilisés peuvent induire des effets secondaires importants chez les patients. Les symptômes liés à l'atteinte des tissus sains de la zone colorectale peuvent être plus ou moins sévères et impacter sévèrement la qualité de vie des patients. La définition d'une nouvelle pathologie, la Pelvic Radiation Disease, en 2010, a permis de concrétiser ces symptômes en leur associant une pathologie réelle, et ainsi, faciliter la prise en charge des patients⁴⁵. Les traitements proposés pour remédier à cette pathologie sont cependant insuffisants à l'heure actuelle et il semble nécessaire de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter efficacement les patients souffrant de PRD. La découverte de l'implication du microbiote dans le développement des atteintes colorectales radio-induites a ouvert la voie vers une nouvelle piste pouvant être étudiée pour rechercher de nouvelles méthodes de traitement. Ainsi, de nombreuses études pré-cliniques et cliniques ont montré l'intérêt d'administrer des probiotiques pour améliorer les altérations induites par l'irradiation des tissus sains colorectaux¹⁶⁵⁻¹⁸¹. La recherche de souches bactériennes d'intérêt pour traiter efficacement les lésions coliques radio-induites est donc en plein essor. *Faecalibacterium prausnitzii* est une bactérie présente dans le côlon et qui possède des fonctions nécessaires au maintien de l'homéostasie du côlon. En clinique, il a été observé une diminution du genre *Faecalibacterium* chez les patients traités par radiothérapie pelvienne¹²⁹, illustrant la réduction de cette bactérie et de ses fonctions après irradiation.

Ce projet de thèse s'est intéressé à l'étude de l'effet de l'administration de *F. prausnitzii* sur les atteintes colorectales radio-induites. Pour cela, nous avons analysé l'effet de ce traitement sur des lésions coliques obtenues grâce à un modèle expérimental reproduisant les altérations observées chez les patients atteints de PRD. Nous nous sommes intéressés à l'efficacité thérapeutique de cette bactérie sur des lésions colorectales obtenues à court terme, qui s'apparentent aux lésions aiguës observées chez le patient, et sur des lésions obtenues à long terme, similaires à des lésions persistantes, également observées chez le patient. Les effets les plus intéressants de l'administration de *F. prausnitzii* ont été observés à court terme, sur les atteintes colorectales aiguës. En effet, nous avons observé une protection de la barrière colique en préservant son intégrité structurelle et fonctionnelle. Nos résultats sur l'efficacité de *F. prausnitzii* pour traiter des lésions persistantes ont été moins concluants. Il semble donc que le traitement par *F. prausnitzii* soit applicable pour prévenir l'apparition de lésions aiguës mais pas de lésions sévères obtenues à plus long terme après irradiation.

Ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur l'intérêt d'utiliser des probiotiques pour empêcher l'établissement de lésions colorectales radio-induites, mais également sur les mécanismes mis en place par *F. prausnitzii* pour agir sur les atteintes coliques. De nouvelles questions se posent à la suite de ces travaux. Tout d'abord, les résultats pré-cliniques de l'efficacité de *F. prausnitzii* sur les lésions aiguës coliques radio-induites que nous avons obtenus peuvent-ils être transférés en clinique ? Quels sont les facteurs à prendre en compte pour pouvoir réussir ce transfert clinique ? Pour une meilleure efficacité et une meilleure prévention des altérations colorectale, les probiotiques sont souvent administrés avant le traitement par radiothérapie. Ces probiotiques, notamment *F. prausnitzii*, peuvent-ils influencer la réponse anti-tumorale ? Quel est le réel impact du microbiote sur l'efficacité de la radiothérapie ? Et inversement, quelle influence possède le traitement anti-tumoral sur le microbiote ? Enfin, la modulation du microbiote intestinal pour traiter les effets secondaires des traitements tumoraux semble être une piste prometteuse. Comment la dysbiose radio-induite peut-elle être prise en charge dans notre système de médecine actuel ?

Ces éléments de réflexion seront abordés dans la partie discussion qui suit, afin d'évaluer quels sont les travaux nécessaires pour continuer à faire avancer les recherches que nous avons entreprises lors de ce projet

Pertinence du modèle expérimental

Le choix du modèle expérimental est une étape importante dans l'établissement d'un projet de recherche. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser un modèle de lésions colorectales radio-induites chez le rat Sprague Dawley. Ce modèle a été développé à l'IRSN depuis 2008 et consiste en une irradiation en dose unique de 29Gy sur une fenêtre de 2 X 3cm de la zone colorectale à l'aide d'un accélérateur linéaire de particules médical délivrant des rayonnements X en faisceau unique avec un débit de 2,5 Gy.m⁻¹²¹. L'accélérateur linéaire est manipulé par un spécialiste physicien et le protocole d'irradiation a été validé par un comité d'éthique.

Le protocole d'irradiation expérimental utilisé s'éloigne du protocole généralement délivré en clinique. En effet, un plan de traitement de protocole de radiothérapie chez l'Homme implique un fractionnement de la dose (2Gy par fraction, 5 fractions par semaine en général, radiothérapie multi-faisceaux) afin de maintenir l'équilibre entre le contrôle tumoral et l'atteinte aux tissus sains. Ce protocole clinique permet de limiter au maximum les effets secondaires radio-induits et d'éviter autant que possible l'apparition de symptômes, notamment colorectaux, chez le patient lors d'une radiothérapie pelvienne. Dans le cadre de ce projet de recherche, notre modèle expérimental a pour but de reproduire les lésions sévères observées chez les patients atteints de PRD. En effet, l'objectif de cette étude est d'analyser l'efficacité thérapeutique d'un traitement sur le développement de ces lésions colorectales radio-induites. Ainsi, la nécessité de développement de lésions expérimentales prévaut sur l'adéquation au plan de traitement utilisé cliniquement. De plus, la radiorésistance des rongeurs induit le besoin de recourir à de fortes doses pour parvenir au développement de lésions colorectales radio-induites. Des études comparatives entre les lésions histologiques chroniques observées sur des biopsies rectales de patients ayant bénéficié d'une radiothérapie pelvienne et les lésions colorectales radio-induites obtenues au cours du temps dans notre modèle rat montre la similarité des atteintes et valident donc la pertinence de notre modèle²⁵⁸.

Le choix du sexe du modèle animal a également été réfléchi. En effet, nous avons utilisé des rats mâles afin d'éviter les biais liés au cycle menstruel ainsi que les atteintes du système reproducteur femelle, qui peut se retrouver dans le champ d'irradiation. Il est important de s'assurer qu'aucun autre organe que le côlon et le rectum ne soit atteint par les rayons ionisants durant le protocole d'irradiation. En effet, l'irradiation de l'intestin grêle induit une forte mortalité des animaux quelques jours après l'irradiation, nous cherchons donc à empêcher leur présence dans le champ d'irradiation. Ainsi, dans notre modèle de rat mâle, la

fenêtre d'irradiation épargne les testicules et l'intestin grêle de l'animal, cette fenêtre nous permet donc de limiter strictement le champ d'irradiation à la zone colorectale uniquement. Pour éviter au maximum l'atteinte de l'intestin lors de l'irradiation, nous plaçons une ceinture abdominale sur l'animal afin de maintenir l'intestin hors de la zone lors de l'irradiation tout au long de la délivrance de la dose.

Différents temps d'irradiation ont été analysés durant cette thèse : Le temps 6h après irradiation nous a permis de visualiser l'apoptose radio-induite des cellules coliques par analyse immunohistochimique (marquage TUNEL). Le temps 3 jours après irradiation pourrait correspondre à l'atteinte aiguë colorectale. L'architecture des cryptes commence à se désagréger, on observe une atypie des cryptes. Associée à ce résultat, l'augmentation de la perméabilité colique 3 jours après irradiation, mesurée par technique *ex vivo* en chambre d'Ussing, reflète la première phase d'altération radio-induite qui va conduire au déclenchement de l'inflammation aiguë. Cette inflammation aiguë est représentée dans notre modèle par l'infiltrat de neutrophiles et de macrophages dans le tissu colique. Le temps 7 jours après irradiation nous permet de visualiser le tissu lorsque l'atteinte de la muqueuse est la plus importante, c'est à ce temps que l'ulcération est la plus étendue. Dans notre modèle expérimental, ce temps se situe entre la période des effets aigus et l'établissement de la lésion à long terme. Enfin, le temps 4 semaines après irradiation s'apparente à une lésion sub-aigüe, les marges de l'ulcération se sont régénérées au fil du temps et l'ulcération restante, moins étendue que celle observée à 7 jours, représente une lésion persistante et irréversible.

L'observation des mécanismes de l'apparition des altérations colorectales radio-induites a été effectuée aux temps 6h et 3 jours après irradiation. Nous avons pu reproduire la séquence des événements radio-induits observés au niveau de la muqueuse colique tels que décrit précédemment dans le laboratoire. L'analyse du temps 6h après irradiation a mis en évidence l'apparition de l'apoptose des cellules de la muqueuse colique. Cette apoptose est liée aux effets directs (dommages de l'ADN cellulaire) et indirects (stress oxydant causé par la formation de radicaux libres) de l'irradiation¹². L'observation de la diminution des cellules progénitrices coliques SOX9 positives, due à leur forte radiosensibilité, est corrélée à la diminution de la prolifération des cellules épithéliales coliques. Ces données sont cohérentes par rapport aux données obtenues précédemment dans notre laboratoire¹⁴. Enfin, la perte des tuft cells DCLK1-positives après irradiation est également le signe de la perte de cellules différenciées coliques. Ce type cellulaire constitue un élément important de la niche colique et possède un rôle dans le maintien de l'homéostasie colique¹⁰. Ainsi, la diminution de leur

nombre induit la perte des fonctions portées par ces cellules et pourrait expliquer la difficulté du tissu à se régénérer après irradiation. En effet, il a été démontré que la délétion des tuft cells DCLK1-positives dans un modèle expérimental de lésions intestinales radio-induites induit une réparation moins efficace²⁵⁹. Enfin, l'inflammation aiguë a été étudiée par des techniques d'immunohistochimie et d'ELISA des protéines de la muqueuse colique. Ces deux techniques d'analyse nous ont permis de faire un parallèle entre les cellules coliques (épithéliales et immunitaires) et les cytokines/chimiokines qui leur sont associées. Ainsi, nous avons pu observer une augmentation de GRO/KC après irradiation, chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles, de même qu'une augmentation de MIP3 α , chimiokine participant à l'activité anti-microbienne des cellules immunitaires innées. Une analyse de la réponse des lymphocytes T périphériques dans les ganglions mésentériques intestinaux et coliques a été effectuée par cytométrie en flux (résultats non présentés dans ce manuscrit). L'étude comparative des populations de lymphocytes Treg, et des lymphocytes sécrétant de l'IL-17 (Th17) n'a pas montré de différence significative entre les groupes contrôles et irradiés. Il semble donc que le temps 3 jours après irradiation soit un temps d'étude trop précoce pour observer des changements dans les populations de lymphocytes T mésentériques et coliques par l'irradiation. A court terme, la réponse immunitaire majoritaire est donc représentée par une activation de l'immunité innée non spécifique.

Les symptômes observés dans notre modèle expérimental apparaissent environ deux semaines après l'irradiation et sont caractérisés le plus généralement par une diarrhée et/ou une hémorragie rectale. Ces symptômes sont liés à l'ulcération sévère colorectale. Dans le cas de la diarrhée, l'augmentation de la perméabilité induit une mauvaise absorption de l'eau contenue dans le bol alimentaire et une forte inflammation, menant à une perturbation du transit intestinal. Nous avons également pu découvrir chez certains animaux, lors de l'euthanasie 4 semaines après irradiation, un rétrécissement de la lumière colique, illustrant les prémices d'une occlusion du côlon.

Ainsi, notre modèle expérimental convient à l'établissement de lésions colorectales radio-induites, aiguës et sub-aiguës, telles que décrites sur le modèle de référence du laboratoire. En effet, il reproduit de façon similaire les lésions histologiques et les symptômes développés en clinique. Ce modèle a déjà été utilisé pour étudier l'efficacité thérapeutique d'un traitement par thérapie cellulaire dans notre laboratoire, en majorité sur des lésions colorectales chroniques après irradiation. Un autre facteur justifiant le choix de ce modèle pour cette étude est qu'il permet d'observer des altérations du microbiote intestinal similaires

à celles retrouvées en clinique. Le rat et l'Homme ne possèdent pas un microbiote identique, mais ce modèle de rongeur a été jugé comme le modèle expérimental le plus adéquat pour étudier les altérations du microbiote en pré-clinique, pour étudier l'implication du microbiote dans le développement de pathologies intestinales par exemple¹⁵⁰. En effet, les phyla principaux, les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Proteobacteria, qui composent le microbiote du rat, comme chez l'Homme, semblent réagir de la même manière à l'irradiation colorectale, par une diminution des populations de Firmicutes et de Bacteroidetes et une augmentation des populations de Proteobacteria²⁶⁰. *F. prausnitzii* est également présente dans le microbiote intestinal du rat, mais sa population est moins importante que celle retrouvée chez l'Homme²⁶¹. Si cette différence de quantité de *F. prausnitzii* entre ces deux espèces peut être considérée comme une limite dans notre étude, il est important de garder à l'esprit que ce projet cherche avant tout à étudier l'efficacité thérapeutique de l'administration de *F. prausnitzii*. En effet, nous nous sommes intéressées dans ces travaux aux fonctions apportées par le traitement avec *F. prausnitzii* et non pas au rétablissement d'une population de *F. prausnitzii* représentative de la réalité.

Vers une utilisation thérapeutique clinique de *F. prausnitzii*

Les résultats que nous avons obtenus sur des lésions coliques aiguës radio-induites dévoilent le potentiel que pourrait avoir cette bactérie dans le traitement préventif des effets secondaires de la radiothérapie pelvienne clinique. En effet, 90% des patients souffrent de symptômes aigus dus à la radiothérapie pelvienne, ces symptômes étant le résultat d'une altération de la barrière et d'une inflammation aiguë, qui impactent fortement la qualité de vie des patients. L'efficacité de *F. prausnitzii* sur ces deux types d'altérations a été démontrée dans notre modèle, son application en clinique pourrait donc permettre de limiter leur développement. De plus, certaines recherches posent l'hypothèse d'une corrélation entre l'apparition d'effets secondaires aigus et le développement d'effets secondaires tardifs à plus long terme, cette hypothèse porte le nom d'effet conséquentiel²⁶². En effet, dans son étude de 2013, Dörr expose l'hypothèse que plus les effets secondaires aigus durant la radiothérapie pelvienne sont importants, plus il y a de risque pour le patient de voir survenir des atteintes chroniques sévères après la fin de la radiothérapie. Cette corrélation fait l'objet de débats, cependant, si on s'appuie sur cette hypothèse, il est intéressant de penser que la capacité de *F. prausnitzii* à diminuer les atteintes aiguës pourrait également permettre de diminuer les risques de développer des lésions tardives chez l'Homme. Suite à ces premiers résultats, quelles sont les études nécessaires pour accompagner ce traitement par *F. prausnitzii* vers un transfert clinique ?

Dans un premier temps, la difficulté majeure que pose cette bactérie est son besoin d'un environnement anaérobie pour survivre. Il est nécessaire de trouver une technique d'administration permettant de garder la bactérie en vie lors de son utilisation. La possibilité d'administrer le surnageant de culture a été envisagée, plusieurs études sur l'utilisation de surnageant de *F. prausnitzii* en condition d'inflammation intestinale démontrent son efficacité sur les mêmes paramètres d'études que la bactérie¹⁹⁸⁻²⁰⁶. L'étude de l'effet du surnageant dans notre modèle de lésion colorectale chronique radio-induite n'a montré aucun effet de ce traitement sur la taille de l'ulcération. Au-delà de la controverse sur l'effet du milieu de culture seul, l'intérêt d'administrer le surnageant de *F. prausnitzii* pose tout de même le souci de son efficacité à long terme. En effet, le surnageant pourrait n'avoir qu'un effet transitoire, une fois les métabolites contenus dans le surnageant consommés, on peut supposer que l'effet s'estomperait au fil du temps. L'implantation de *F. prausnitzii* dans le microbiote permettrait d'avoir une sécrétion continue des métabolites importants pour le bénéfice thérapeutique de la bactérie et induirait donc un effet thérapeutique pérenne. Ainsi, à mon sens, il est plus intéressant de se concentrer sur la recherche d'une méthode d'implantation efficace de la

bactérie dans le côlon, afin d'avoir un traitement durable sur le long terme, plutôt que d'administrer les métabolites actifs qui ont un effet limité dans le temps et nécessite donc une prise de traitement continue.

Les études cliniques publiées au sujet de la dysbiose induite par radiothérapie pelvienne montrent une altération du microbiote fécal¹²⁹⁻¹³², cette dysbiose radio-induite concerne donc majoritairement le microbiote du côlon. *F. prausnitzii* est une bactérie colique, c'est dans le côlon que l'on retrouve une population importante de cette bactérie et c'est donc également dans cet organe qu'elle possède une grande importance d'un point de vue fonctionnel dans le microbiote. Est-il donc nécessaire que le traitement par *F. prausnitzii* passe par l'intégralité du tube digestif ? La technique d'administration de la bactérie, par administration intra-gastrique, semble peu appropriée dans la mesure où nous recherchons à implanter *F. prausnitzii* dans le côlon. En effet, après administration intra-gastrique, la bactérie va parcourir l'intégralité du tractus gastro-intestinal avant de pouvoir arriver dans le côlon. De plus, la dose nécessaire de probiotiques à administrer pour observer un effet bénéfique optimal est encore à définir. Cependant, une étude récente de l'effet d'un probiotique sur la survie de modèle murin d'irradiation en corps entier suggère que la dose de 10⁹ CFU est nécessaire pour observer un effet thérapeutique significatif, en comparaison à des doses administrées plus faibles²⁶³. Cette étude nous permet donc d'affirmer que la quantité à administrée est une variable essentielle à prendre en compte dans l'établissement d'un protocole de traitement. Dans notre étude, la technique de gavage intra-gastrique nous permet de contrôler la dose de *F. prausnitzii* administrée, mais nous ne connaissons pas la dose finale arrivant dans le côlon. En effet, la quantité initialement administrée va diminuer au fur et à mesure de son voyage dans le tractus, par l'action de la digestion, notamment par l'acidité gastrique. L'oxygène, dont la concentration diminue au fur et à mesure du parcours dans le tractus, est également un facteur pouvant atténuer la quantité de *F. prausnitzii* vivantes qui arrivent jusqu'au côlon. Afin d'augmenter la quantité de *F. prausnitzii* retrouvée dans le côlon après son administration, nous devons nous concentrer sur des méthodes capables de maintenir la bactérie vivante jusqu'à son arrivée dans le côlon. Plusieurs options se dessinent pour permettre d'augmenter la survie de *F. prausnitzii* durant son administration : une méthode d'injection intra-rectale ou l'association avec un composant qui serait capable de la protéger de l'oxygène et de l'effet de la digestion.

Une instillation rectale de la bactérie permettrait d'augmenter les chances d'implantation, voire même de diminuer le nombre d'administration et la concentration administrée, puisque

ces facteurs sont généralement calculés en comptant la perte induite par le gavage intra-gastrique. L'injection intra-rectale a déjà été utilisée en pré-clinique et en clinique pour administrer des probiotiques²⁶⁴⁻²⁶⁶, l'une des études clinique montrant même une meilleure efficacité du traitement administré par voie rectale que le traitement par voie orale.²⁶⁴ Cette méthode d'administration permettrait alors de contrôler la quantité de *F. prausnitzii* apportée dans le côlon et pourrait potentiellement augmenter l'efficacité thérapeutique sur les paramètres physiopathologiques que nous avons observés.

La deuxième voie d'administration d'intérêt consiste en l'encapsulation de *F. prausnitzii*. Dans l'idéal, le composant utilisé pour protéger *F. prausnitzii* pourrait également agir comme un prébiotique, afin d'augmenter les chances de survie de la bactérie lors d'une administration par voie orale. La gomme arabique, ou gomme d'acacia, est une fibre soluble et fermentescible. Il s'agit d'un polysaccharide hautement ramifié, rendant son processus de fermentation lent. Sa fermentation débute dans le côlon transversal et se poursuit dans le côlon descendant. Elle peut être utilisée en tant que prébiotique et a montré une capacité à moduler la composition du microbiote, notamment en augmentant la population de *F. prausnitzii*²⁶⁷, et en augmentant la production d'acides gras à chaîne courte par le microbiote (butyrate et propionate)^{267,268}. Une encapsulation de *F. prausnitzii* dans une gélule de gomme d'acacia pourrait permettre une meilleure survie de la bactérie, en la protégeant le long de son voyage dans le tractus gastro-intestinal et en lui fournissant des nutriments. La gomme d'acacia a été utilisée en clinique pour encapsuler des molécules médicamenteuses, comme l'héparine, et a augmenté sa biodisponibilité et son effet thérapeutique chez l'Homme²⁶⁹. Cette technique serait donc potentiellement un excellent moyen d'appliquer un traitement par *F. prausnitzii* en clinique pour contrer la difficulté liée à sa sensibilité à l'oxygène.

L'importance de l'analyse de l'effet de *F. prausnitzii* sur la tumeur se pose également puisque nous avons choisi dans ce projet de l'administrer en préventif, 3 à 7 jours avant l'irradiation. Cette bactérie peut donc potentiellement se retrouver en présence d'une tumeur et influencer sa progression. *F. prausnitzii* produit, ou participe à la synthèse, de nombreux métabolites²⁷⁰. Ces métabolites lui permettent d'agir sur l'épithélium colique, notamment le butyrate, source d'énergie pour les colonocytes et la glutamine, source d'énergie potentielle pour les cellules souches. Quels sont les effets de ces métabolites sur la tumeur ?

Le butyrate participe à la suppression de la croissance tumorale par différents mécanismes : inhibition de la migration cellulaire, de l'invasion cellulaire, de métastase, d'angiogénèse

vasculaire et induction de mort cellulaire programmée²⁷¹. Mais son mécanisme d'action majeur semble être l'inhibition des enzymes responsables de la déacétylation, les déacétylases d'histone (HDAC)²⁷². L'hypoacétylation est un facteur participant à l'initiation de la tumeur. En inhibant l'acétylation, le butyrate participe donc au contrôle tumoral. Le butyrate est également capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses et de diminuer le stress oxydant par augmentation du taux d'H₂O₂²⁷². L'utilisation de bactéries anaérobies productrices de butyrate est une thérapie envisagée pour le ciblage de la tumeur²⁷². La tumeur possède des régions hypoxiques et anoxiques, formant un environnement propice à la croissance des bactéries anaérobies, leur permettant une action localisée spécifiquement sur la tumeur par la production de butyrate. Les bactéries anaérobies, par leur sensibilité à l'oxygène, vont être attirées par cet environnement anoxique sur la tumeur et vont ainsi cibler spécifiquement ces régions. Ohkawara *et al* ont observé un effet préventif de l'administration de *Butyrivibrio fibrisolvens*, une bactérie anaérobie productrice de butyrate, sur l'initiation de tumeur colorectale chez la souris²⁷³. *F. prausnitzii* pourrait donc limiter la croissance de la tumeur par la sécrétion de butyrate.

La glutamine, est souvent associée à un risque de développement et de croissance tumorale²⁷⁴. Cependant, des études pré-cliniques ont également observé qu'une supplémentation en glutamine ne stimule pas la croissance tumorale^{275,276} et semble même la diminuer en stimulant la réponse immunitaire (lymphocytes T et Natural Killer)^{277,278}. De plus, l'effet d'un traitement par administration orale de glutamine a été analysé dans plusieurs études cliniques sur l'incidence de l'inflammation de muqueuse par chimiothérapie ou radiothérapie chez des patients atteints de cancer de différents types et aucun effet n'a été observé sur la réponse à la thérapie anti-tumorale^{279,280}. Compte tenu de l'incertitude de l'effet de certains métabolites connus (et peut-être encore inconnus) de *F. prausnitzii* sur la tumeur, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'administration de *F. prausnitzii* ou de son surnageant sur la croissance tumorale dans un modèle expérimental afin d'obtenir les données nécessaires avant le transfert d'un traitement par *F. prausnitzii* vers la clinique.

Nos résultats montrent une activation possible de l'inflammasome par *F. prausnitzii* après irradiation, avec une augmentation des taux d'IL-1 β et d'IL-18, cytokines associées à l'activation de l'inflammasome dans la muqueuse colique. Une étude intéressante a démontré que des souris déficientes en composants de l'inflammasome NLRP3 ont un développement exacerbé de métastase de cancer colorectal dans le foie²⁸¹. Cet effet est dû à la perte de la sécrétion d'IL-18, dont la présence est nécessaire pour observer une suppression efficace des

métastases. L'activation de l'inflammasome NLRP3 est liée à l'activation des cellules Natural Killer par l'IL-18, ces deux évènements apparaissent comme indispensables pour inhiber la croissance des cellules colorectales cancéreuses dans le foie. L'inflammasome NLRP3 peut être activé par des ligands microbiens, provenant du microbiote intestinal²⁸² et le foie est exposé à des produits microbiens intestinaux provenant de la circulation de la veine portale. On peut donc penser que *F. prausnitzii*, si elle est capable d'activer l'inflammasome par la sécrétion de ligands, pourrait également empêcher le développement de métastase chez les patients atteints de cancer colorectal.

Beaucoup d'études sont encore nécessaires pour analyser l'effet de *F. prausnitzii* sur l'environnement tumoral, pour compléter nos résultats sur son utilisation dans le traitement des lésions coliques radio-induites, mais également pour rechercher des méthodes d'administration optimale, afin d'améliorer sa capacité thérapeutique. Lorsque l'innocuité du traitement par *F. prausnitzii* aura été prouvée, il sera alors envisageable d'appliquer son utilisation en clinique pour traiter les effets secondaires aigus de la radiothérapie pelvienne.

Interactions entre microbiote intestinal et traitement anti-tumoral

Plusieurs études pré-cliniques et cliniques ont démontré l'implication du microbiote intestinal dans l'apparition des symptômes associés à la radiothérapie pelvienne¹²⁹⁻¹³². Certaines recherches ont approfondi cette observation en montrant que la variabilité des patients à développer des effets secondaires après radiothérapie pelvienne est liée à la composition de leur microbiote intestinal avant la radiothérapie¹²⁹⁻¹³¹. Il est important d'identifier quels sont les facteurs impliqués dans ce changement de composition du microbiote avant la radiothérapie. En plus de l'impact de l'alimentation, de la prise d'antibiotiques et de la dysbiose liée au cancer¹²⁶, le rythme circadien semble être un élément pouvant participer à la modulation du microbiote. Cet élément pourrait jouer un rôle dans l'établissement d'un microbiote pouvant sensibiliser le patient au traitement par radiothérapie.

Plusieurs études cliniques et pré-cliniques exposent l'hypothèse que le rythme circadien pourrait influencer la réponse de la tumeur à l'irradiation ainsi que l'apparition de symptômes intestinaux radio-induits²⁸³. La modulation circadienne de la radiosensibilité serait liée à plusieurs variables : la phase de cycle cellulaire dominante, la sécrétion d'hormone (dont la mélatonine) et la composition du microbiote intestinal, associée à la production d'acides gras à chaîne courte. L'étude pré-clinique de la variation dans la composition du microbiote durant la journée a montré l'influence du rythme circadien sur les populations de micro-organismes présents dans notre organisme et l'impact de cette variation sur la réponse à l'irradiation^{284,285}. Il est important de noter que les patients atteints de cancer souffrent généralement de troubles du sommeil, comme l'insomnie²⁸⁶. La perturbation du sommeil entraîne un dérèglement du rythme circadien, qui pourrait alors induire une plus forte radiosensibilité, notamment par une dysbiose du microbiote intestinal. En effet, des études pré-cliniques, la perturbation du rythme circadien est associée à une altération du microbiote intestinal, notamment une perte de la diversité²⁸⁴. Dans une autre étude pré-clinique, Cui *et al.* observent une corrélation entre microbiote déséquilibré par une perturbation circadienne et augmentation de la radiosensibilité de l'hôte²⁸⁵. En clinique, Wang *et al.* établissent un lien entre dysbiose radio-induite, fatigue et diarrhée induite par radiothérapie pelvienne¹²⁹. Ces recherches amènent une nouvelle variable dans l'étude de la prévention de la toxicité intestinale radio-induite. En effet, la prise en compte de l'équilibre du rythme circadien pourrait permettre une meilleure mise en place de la radiothérapie pour les patients et une meilleure prise en charge de leurs symptômes radio-induits.

Si le microbiote est capable d'influencer la réponse à l'irradiation du tissu sain colorectal, est-il également capable de moduler le contrôle tumoral apporté par la radiothérapie ? A l'heure

actuelle, il existe très peu d'études de l'effet du microbiote sur l'efficacité anti-tumorale de la radiothérapie. Certaines recherches suggèrent que le microbiote pourrait être capable d'augmenter la radiosensibilité des cellules tumorales. L'équipe de Bettegowda a observé en 2003 une amélioration de l'effet anti-tumoral de la radiothérapie après injection de spores bactériennes de *Clostridium novyi* dans un modèle expérimental de tumeur sous-cutanée²⁸⁷. Comme expliqué dans la partie précédente, la tumeur peut posséder des régions hypoxiques, c'est-à-dire sans oxygène, pouvant compromettre l'efficacité de la radiothérapie et donc le contrôle tumoral²⁸⁸. En effet, la destruction de la tumeur par radiothérapie nécessite la présence d'oxygène et il a été observé que les cellules hypoxiques résistent jusqu'à trois fois plus aux rayons ionisants que les cellules normoxiques^{289,290}. La bactérie utilisée dans cette étude est anaérobie stricte, elle a permis d'augmenter l'effet anti-tumoral de l'irradiation sur la destruction de la tumeur par son ciblage spécifique des zones hypoxiques. Cette amélioration de l'effet a été observée sur trois types de radiothérapie : la radiothérapie externe, la brachythérapie et la radio-immunothérapie. L'administration de la bactérie seule permet une diminution de la tumeur, mais ne la supprime pas totalement, l'association avec la radiothérapie reste nécessaire pour éradiquer la tumeur efficacement. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le mécanisme d'action des bactéries dans cette contribution à la suppression de la tumeur : La sécrétion de métabolites bactériens (comme le butyrate), la réponse inflammatoire de l'hôte contre les bactéries pourrait atteindre les cellules tumorales et induire de manière non spécifique leur suppression, ou les bactéries induiraient une augmentation de la réponse immunitaire spécifique de l'hôte vers la tumeur.

Une autre étude a démontré en 2008 que, dans le cas d'une myéloablation par radiothérapie, la translocation bactérienne permet d'augmenter l'activité cytotoxique des lymphocytes T chez les patients atteints de mélanome métastatique²⁹¹. Ces résultats montrent une amélioration de l'effet de la radiothérapie anti-cancéreuse par le microbiote, mais cette amélioration est liée à un mécanisme associé à des effets secondaires, l'augmentation de la perméabilité, qui est généralement délétère pour le patient.

Très récemment, Uribe-Herranz *et al.* ont étudié l'effet d'un traitement par la vancomycine, un antibiotique capable d'éliminer les bactéries Gram positives, sur l'efficacité anti-tumorale de la radiothérapie²⁹². L'équipe a observé qu'en déléant le microbiote intestinal de ces bactéries, notamment les bactéries productrices de butyrate, la radiothérapie exerçait un meilleur contrôle tumoral sur des tumeurs pulmonaires et cervicales induites dans un modèle murin. Cette étude est intéressante car elle montre que le microbiote peut également

influencer négativement l'efficacité anti-tumorale du traitement par la radiothérapie. Dans leurs travaux, Uribe-Herranz *et al.* démontrent que l'administration de vancomycine améliore la réponse immunitaire anti-tumorale induite par l'irradiation par rapport à des souris non traitées, en augmentant l'activité des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes T CD8 anti-tumoraux. Le butyrate, produit en grande majorité par les bactéries atteintes par la vancomycine, induit une diminution de cette activité. Ces résultats soulignent la complexité des interactions entre le microbiote et la réponse immunitaire anti-tumorale induite par la radiothérapie. Il est important de continuer la recherche dans ce domaine pour comprendre les mécanismes sous-jacents de ces interactions. Le microbiote joue un rôle certain dans la réponse du tissu sain et tumoral à la radiothérapie. La modulation des populations bactériennes semble donc être une stratégie thérapeutique intéressante pour potentialiser le contrôle tumoral de la radiothérapie et traiter les effets secondaires intestinaux qui lui sont associés.

Les autres traitements anti-cancéreux utilisés couramment induisent également des effets secondaires intestinaux liés à des changements dans la composition du microbiote. La chimiothérapie et l'immunothérapie peuvent conduire à l'apparition de toxicité intestinale, associée à une inflammation de l'intestin ou du côlon^{293,294}. Des études cliniques et pré-cliniques de l'effet des probiotiques sur l'inflammation intestinale induite par chimiothérapie montrent l'intérêt de ce type de traitement par modulation du microbiote^{168,295}, tandis que les études de l'effet de probiotiques contre les effets secondaires de l'immunothérapie n'en sont qu'au stade pré-clinique pour le moment²⁹⁶.

Le rôle du microbiote dans l'apparition des effets secondaires des traitements anti-tumoraux a été grandement étudié, alors que son impact sur la réelle efficacité des thérapies anti-cancéreuses est encore peu connu. Plusieurs études pré-cliniques et cliniques ont démontré l'influence du microbiote intestinal sur la réponse aux traitements anti-cancéreux. Dans le cas de la chimiothérapie, le microbiote est capable de réguler la pharmacocinétique des molécules administrées, notamment en modulant le taux d'absorption et la biodisponibilité d'un médicament oral et ainsi influencer le passage de la molécule dans la circulation sanguine²⁹⁷. Le microbiote peut également entrer dans la voie de transformation de la molécule de chimiothérapie par action enzymatique²⁹⁸. Lehouritis *et al.* ont étudié l'effet de deux bactéries (*E. coli* et *L. welshimeri*) sur l'efficacité anti-tumorale de 30 traitements de chimiothérapie. Les résultats ont démontré la capacité de ces bactéries à améliorer, mais également à inhiber, l'efficacité de 6 et 10 produits, respectivement²⁹⁹. Cette étude démontre

qu'il existe des interactions variables et complexes entre certains agents chimiothérapeutiques et le microbiote intestinal. En effet, ce dernier joue un rôle différent sur l'efficacité du produit en fonction du type et du mode d'action de l'agent de chimiothérapie.

L'immunothérapie est récemment entrée dans l'arsenal des traitements anti-cancer, notamment les inhibiteurs de checkpoint immunitaire, comme l'anti-PD1, qui a montré un fort effet anti-tumoral lors d'études cliniques et pré-cliniques³⁰⁰. Le mécanisme de cette thérapie passe par la suppression de l'interaction entre le récepteur PD1, situé sur les lymphocytes T et son ligand associé, PDL1, situé sur la tumeur, grâce à un anticorps spécifique. Cependant, la réponse thérapeutique à ce type d'immunothérapie en clinique varie entre les patients. La transplantation de matière fécale provenant des patients répondant positivement ou résistant au traitement par anti-PD1 dans des souris axéniques a permis de montrer l'implication du microbiote dans la réponse à la thérapie par anti-PD1³⁰¹. En effet, les souris transplantées avec des fèces de patients répondant à l'immunothérapie y ont également positivement répondu et les souris transplantées avec des fèces de patients résistant au traitement ont également résisté à la thérapie. Ainsi, l'implication du microbiote dans la variabilité de la réponse à l'immunothérapie par anti-PD1 a été démontrée. L'étude de la corrélation entre la composition du microbiote et la réponse à la thérapie a mis en lumière la présence de bactéries qui pourraient être capables de potentialiser l'efficacité thérapeutique de l'immunothérapie, comme *Akkermansia muciniphila* et *Enterococcus hirae*³⁰¹. L'équipe ayant effectué ces recherches envisage des solutions thérapeutiques permettant de préparer le patient à l'immunothérapie en analysant son microbiote intestinal et en l'adaptant par traitement microbiologique (probiotiques, voire transplantation fécale) pour permettre une efficacité optimale du traitement.

Grâce à ces études cliniques et pré-cliniques, nous savons désormais que le microbiote, par la sécrétion de métabolites, la modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale ou la modification du micro-environnement tumoral, peut participer à la destruction de la tumeur. Cependant, ces recherches sur l'impact du microbiote intestinal sur la réponse aux traitements anti-tumoraux suggèrent la possibilité qu'une bactérie puisse avoir un effet bénéfique sur un traitement et négatif sur un autre. Pour améliorer l'efficacité anti-tumorale, les thérapies sont souvent combinées, comme c'est le cas de la radiochimiothérapie concomitante. Il est donc important de s'assurer qu'un probiotique administré n'influence pas négativement les agents chimiothérapeutiques qui peuvent être associés à une radiothérapie et ainsi, éviter d'induire une perte de l'efficacité anti-tumorale. Dans le cas d'un traitement

préventif par *F. prausnitzii*, il semble important d'analyser son effet sur l'action anti-tumorale de plusieurs agents chimiothérapeutiques pour s'assurer que son administration en clinique ne compromette pas leur efficacité.

Perspectives du traitement de la dysbiose radio-induite clinique

La société occidentale actuelle est à la recherche de l'optimisation de la santé et des performances physiques, et cherche à réduire les risques d'accidents vasculaires, de cancer et de maladies neurologiques liées à l'âge. Des études récentes sur l'implication du microbiote dans le développement de ces pathologies et la médiatisation de ces recherches au grand public conduit donc de plus en plus de personnes à recourir aux probiotiques pour prévenir l'apparition de maladies potentiellement liées à la composition du microbiote. La nutraceutique est un terme employé pour décrire des aliments ou des produits enrichis en ingrédients bénéfiques pour la santé, le marché global associé à ce type de produit est en plein essor depuis plusieurs années³⁰². Les probiotiques entrent dans cette catégorie, ils sont considérés comme des compléments alimentaires et ne sont réglementés par aucune agence de régulation du médicament, quel que soit le pays. L'Organisation Mondiale de la Santé a conclu dans un rapport de 2005, que les probiotiques « peuvent être généralement considérés comme sans danger », tout en admettant que les probiotiques peuvent être responsables d'effets néfastes comme : une infection systémique, une activité métabolique délétère, une réponse immunitaire excessive chez certains individus ou un transfert de gène³⁰³. Cependant, l'apport d'une grande quantité de bactérie dans l'organisme ne peut pas être considéré comme anodin. Il est donc nécessaire d'avertir la société sur les risques que peut engendrer la prise de probiotiques de manière inadéquate, notamment pour la population à risque, comme les individus au système immunitaire affaibli, les individus dont le microbiote est en dysbiose et/ou la barrière intestinale altérée. Plusieurs cas de septicémie ont été rapportés, notamment chez des patients atteints de pathologies inflammatoires intestinales^{304,305}. Les patients atteints d'effets secondaires de la radiothérapie pelvienne font également partie des individus potentiellement à risque lors de la prise de probiotiques, il est donc important de les informer des risques de l'automédication avec des probiotiques et de les encourager à discuter avec leur médecin des probiotiques qui pourraient convenir à leur cas médical.

Les études cliniques ont révélé une grande variabilité dans les microbiotes des patients avant leur radiothérapie pelvienne, notamment chez les patients ayant développé des symptômes liés à une toxicité intestinale radio-induite¹²⁹⁻¹³¹. La corrélation entre le microbiote déséquilibré avant irradiation et l'incidence des effets secondaires intestinaux radio-induits souligne le réel besoin d'effectuer un plus grand nombre d'études cliniques sur le microbiote avant la radiothérapie afin d'établir un profil type du microbiote pouvant conduire à l'apparition de symptômes radio-induits. La prise en charge des patients pendant l'élaboration de leur protocole de traitement par radiothérapie impliquerait alors une analyse du

microbiote du patient en amont du début de la thérapie. Si le microbiote possède des caractéristiques proches du microbiote déterminé comme inducteur de toxicité, l'oncologue proposerait des conseils au patient afin de moduler la composition de son microbiote avant la thérapie. Des conseils diététiques, comme le suivi d'un régime alimentaire riche en fibres ou la prise de probiotiques spécifiques, comme *F. prausnitzii*, pourraient être donnés au patient. Des conseils sur l'hygiène de vie peuvent également lui être prodigués, avec une attention particulière sur l'état du sommeil du patient, puisque nous avons vu que ce paramètre est important dans la composition du microbiote et dans la radiosensibilité du tissu sain (voir partie « Interactions entre le microbiote et le traitement anti-tumoral » de la discussion). En dernier recours, si le microbiote ne retrouve pas un équilibre après l'application des conseils du médecin, une TMF pourrait être proposée au patient, sur le même principe de la recherche de l'amélioration de l'immunothérapie par TMF³⁰¹. Cette prise en charge s'apparenterait à une médecine personnalisée, puisque chaque microbiote est unique. On peut donc penser qu'il sera un jour possible d'appliquer ce genre d'analyse pour prévenir de l'apparition de la toxicité intestinale radio-induite.

Pour approfondir la recherche sur l'approche thérapeutique des lésions colorectales radio-induites par le rétablissement du microbiote, une thèse a débuté dans notre laboratoire en novembre 2019 sur l'effet d'un traitement par transplantation fécale. En effet, nous avons observé dans nos résultats que *F. prausnitzii* ne permet pas de traiter les lésions colorectales persistantes, il est donc intéressant de rechercher une méthode thérapeutique alternative permettant de traiter ce type de lésion. Le microbiote est un composant important dans le développement des effets secondaires de la radiothérapie pelvienne. Par conséquent, il est important de rechercher des méthodes capables de rétablir un microbiote sain chez les patients traités par radiothérapie et l'une de ces méthodes pourrait être la transplantation fécale. Cette méthode a déjà montré son efficacité dans le traitement de plusieurs pathologies liées à une dysbiose, notamment les MICI³⁰⁶. Durant ce projet, les animaux irradiés recevront une transplantation fécale à partir de fèces provenant d'animaux contrôles non irradiés, par voie intra-gastrique ou rectale. L'effet du traitement sera étudié par différentes analyses, notamment des analyses structurales et fonctionnelles du côlon. Très peu d'études ont analysé l'efficacité d'un traitement par TMF pour diminuer la toxicité intestinale radio-induite, mais les résultats obtenus montrent le potentiel de ce type de thérapie¹⁶⁰. Cette thèse apportera donc des données supplémentaires sur l'intérêt de la modulation du microbiote pour traiter les effets secondaires de la radiothérapie pelvienne.

L'étude de l'utilisation de la TMF pour traiter les effets secondaires des traitements anti-tumoraux est déjà effective en clinique. En effet, dans l'optique de rétablir le microbiote des patients à l'état antérieur à la chimiothérapie, l'entreprise MaaT Pharma propose aux patients de conserver des échantillons de leur fèces pour effectuer une transplantation de leur propre matière fécale après la fin de leur chimiothérapie³⁰⁷. Cette initiative thérapeutique a été démontrée comme bénéfique lors d'études pré-cliniques, et l'entreprise entreprend plusieurs essais cliniques pour prouver l'efficacité de cette thérapie chez l'Homme. Des résultats sur un essai clinique de phase 1b/2a, nommé ODYSSEE, ont été communiqués récemment³⁰⁷. Les matières fécales de 25 patients atteints de leucémie myéloïde aigüe ont été collectées avant le début de leur traitement intensif par chimiothérapie et par antibiotiques. A la fin de leur première phase de traitement, les patients ont reçu deux auto-transplantations fécales, à 24h d'intervalle, avant de commencer leur deuxième phase de thérapie. Une restauration significative du microbiote a été observée, avec plus de 90% de la diversité des espèces microbiennes et de la structure du microbiote rétablis 10 jours après la TMF. Une diminution significative des populations bactériennes pro-inflammatoires et une augmentation des bactéries bénéfiques, comme les familles Lachnospiraceae et Ruminococcaceae ont également été constatées. Enfin, l'analyse du taux de néoptérine fécale, un biomarqueur d'inflammation, montre une diminution de l'inflammation intestinale. La TMF a été bien tolérée et n'a pas provoqué d'effet secondaire chez les patients. Ces résultats sont encourageants et démontrent l'intérêt de cibler le microbiote pour prévenir et traiter ce type de pathologie inflammatoire intestinale induite par thérapie anti-tumorale.

Conclusion générale

La dysbiose est un élément important qui contribue à l'apparition de symptômes colorectaux après radiothérapie pelvienne. Cependant, d'autres études sont encore nécessaires pour déterminer le rôle joué par ce changement dans la composition du microbiote dans le développement d'atteintes colorectales radio-induites. Les observations cliniques récentes de la corrélation entre dysbiose, fatigue et diarrhée pendant la radiothérapie pelvienne¹²⁹ pourrait être une piste intéressante à approfondir. En effet, une dysbiose avant le traitement par rayons ionisants semble être un élément fortement contributeur, voire déclencheur, de l'atteinte colorectale, représentant un microbiote déjà affaibli et dont la fonctionnalité, importante pour l'homéostasie, pourrait avoir été détériorée. Cette perte des fonctions du microbiote pourrait alors compromettre le maintien d'une barrière épithéliale colique efficace, nécessaire à la sauvegarde d'un côlon sain et capable de résister aux atteintes induites par les rayonnements ionisants. *F. prausnitzii* est une bactérie très importante dans le maintien de cette barrière, et la diminution de sa population après radiothérapie est le signe d'un microbiote altéré. Pour remédier à cette altération, notre projet étudie la capacité de *F. prausnitzii* à renforcer la barrière colique en prévention d'une irradiation, par le rétablissement de ses fonctions dans le côlon.

Notre étude apporte des premiers résultats démontrant que l'administration préventive de *F. prausnitzii* est efficace pour maintenir une intégrité structurale et fonctionnelle du côlon à court terme dans un modèle expérimental permettant d'obtenir des atteintes colorectales induites par irradiation. Cette efficacité n'a cependant pas été observée dans le cas d'ulcération sévère et persistante, obtenue à plus long terme dans le même modèle expérimental. Les modalités d'administration que nous avons effectuées constituent des résultats préliminaires démontrant l'importance d'établir un protocole de traitement adapté. Des recherches supplémentaires seraient nécessaires pour approfondir ces résultats et permettre de définir le protocole optimal, en variant la fréquence, la dose administrée et en testant différentes méthodes d'administration.

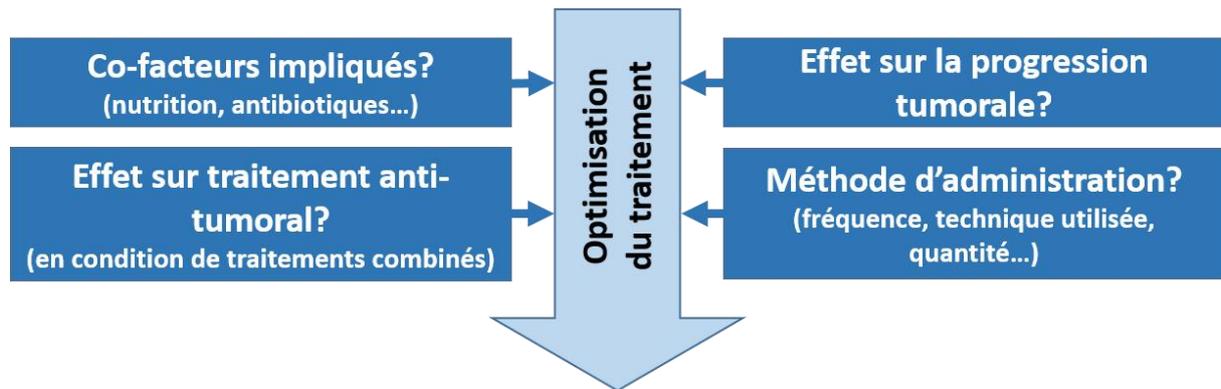
Si nous nous concentrons sur les résultats à court terme, nous pouvons suggérer que l'administration de *F. prausnitzii* permettrait de diminuer les atteintes aiguës observées durant la radiothérapie pelvienne en clinique. Ce type d'atteinte concerne 90% des patients et serait lié à l'apparition d'atteintes tardives, se développant après la fin de la radiothérapie. Ainsi, un traitement par *F. prausnitzii* permettrait d'atténuer les atteintes à court terme ainsi que l'apparition des atteintes tardives. Cependant, nos résultats nous ont également permis de mettre en évidence la capacité potentielle de cette bactérie à activer l'inflammasome. Des

études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'innocuité d'un traitement par *F. prausnitzii*, notamment dans un contexte tumoral.

Nos résultats sur l'administration à long terme appuient l'importance de considérer que la prise de *F. prausnitzii*, et des probiotiques en général, doit être contrôlée. En effet, en fonction de la dose administrée et de la fréquence d'administration, les effets du traitement peuvent fortement varier et peuvent, dans certains cas, devenir néfastes. Ainsi, sans protocole précis de prise de traitement, les patients se procurant des probiotiques pourraient s'exposer à un risque pour leur santé s'ils ne sont pas pris judicieusement. Il est donc primordial de définir rigoureusement la posologie adéquate, de communiquer sur les risques potentiels des probiotiques s'ils sont consommés sans prudence et d'encourager les médecins à participer à cette prise de conscience en engageant la discussion à ce sujet avec leurs patients.

Ce projet a permis de mettre en évidence l'importance de préserver les fonctions de *F. prausnitzii* dans le microbiote pour diminuer les atteintes colorectales aiguës radio-induites. Nos résultats corroborent donc la stratégie thérapeutique visant à moduler le microbiote pour empêcher le développement des effets secondaires à la radiothérapie pelvienne. La transplantation fécale est une technique permettant une modulation du microbiote dans sa globalité et pourrait s'avérer être un traitement efficace dans la prévention de l'apparition de lésion colorectale radio-induite. Le microbiote fécal humain est composé en majorité de bactéries anaérobies strictes. Actuellement, pour des raisons pratiques, la préparation des échantillons de fèces pour la transplantation fécale est effectuée à l'air ambiant. Cependant, ces conditions de préparation de la transplantation peuvent conduire à la diminution de la viabilité de certaines bactéries anaérobies importantes, dont *F. prausnitzii*³⁰⁸. Ainsi, nous pourrions envisager de compléter la transplantation fécale par une administration de *F. prausnitzii* pour maintenir sa population dans les échantillons transplantés et augmenter l'efficacité thérapeutique du traitement.

Efficacité pré-clinique de *F. prausnitzii*



Transfert clinique

Figure 35 : Schéma récapitulatif des problématiques à résoudre pour optimiser le traitement par *F. prausnitzii* dans la prise en charge des effets secondaires colorectaux de la radiothérapie pelvienne et envisager un transfert clinique du traitement.

ANNEXES

ANNEXE 1 : INFLUENCES DE FACTEURS EXOGENES ET ENDOGENES DANS L'APPARITION DE DYSBIOSE INTESTINALE HUMAINE

Alimentation et mode de vie

En fonction du lieu géographique, l'entérotype du microbiote des individus varie. Cette différenciation géographique est fortement liée à la culture gastronomique, aux habitudes alimentaires des habitants. Ainsi, le microbiote agraire, lié à une alimentation riche en fibres, est différent du microbiote occidental, consommant des aliments riches en graisse. Les populations des continents en voie de développement, comme l'Afrique ou l'Amérique du Sud, se nourrissent en majorité de produits issus de l'agriculture (céréales, fruits, légumes), fortement concentrés en polysaccharides. Les populations occidentales, comme l'Amérique du Nord ou l'Europe, ont une alimentation représentée par une forte consommation de viande rouge, de graisse animale, de sucre et par un faible apport en fibres. Le régime agraire est associé à un microbiote diversifié³⁰⁹, avec pour phyla dominants les Firmicutes et les Proteobacteria. Le régime occidental possède, quant à lui, les Bacteroides et les Actinobacteria comme phyla dominants³¹⁰.

Le suivi d'un régime riche en graisse induit une diminution de la diversité du microbiote chez des modèles animaux³¹¹. La perte de diversité est fortement corrélée à l'apparition de pathologies inflammatoires (Crohn, rectocolite)³¹² et métaboliques (obésité, diabète)^{121,313}. L'analyse du microbiote d'immigrants thaïlandais aux Etats Unis a démontré un changement dans la composition de leur microbiote, ainsi qu'une augmentation du taux de surpoids et d'obésité³¹⁴. Cette population montre une diminution de certaines espèces bactériennes natives de Thaïlande, une perte dans leur diversité microbienne ainsi que d'enzymes impliquées dans la dégradation de fibres végétales. L'acculturation alimentaire vers un régime riche en graisse pourrait expliquer ce constat, cependant d'autres facteurs sont également à prendre en compte (stress, qualité de l'eau potable, médicaments...).

L'exercice physique permet également de moduler les populations du microbiote intestinal. En effet, une étude du microbiote chez des souris nourries par un régime riche en graisse a démontré que l'exercice physique permet d'augmenter les populations commensales du microbiote, notamment les bactéries productrices de butyrate, et de diminuer l'abondance de bactéries productrices de LPS³¹⁵. Chez l'humain, la pratique d'une activité sportive induit une augmentation de la diversité du microbiote et de l'abondance de bactéries productrices

de butyrate. L'arrêt de l'activité physique induit un retour au microbiote initial, avant le début de la pratique sportive³¹⁶. Enfin, une étude comparative du microbiote chez des femmes « actives » et « sédentaires » ne démontre pas de modulation du profil du microbiote (pas de changement dans la diversité, ni dans le ratio Bacteroides/Firmicutes). Cependant, certaines espèces commensales très importantes pour l'homéostasie intestinale, telle que *Roseburia hominis*, *Akkermansia muciphila* et *Faecalibacterium prausnitzii*, ont vu leur population augmenter chez les femmes pratiquant une activité physique régulière (dose minimum de pratique sportive recommandée par l'OMS)³¹⁷.

Médicaments

L'utilisation d'antibiotiques dans le cadre de traitement contre les infections bactériennes (intestinale, respiratoire, urinaire...) est une pratique courante dans notre médecine actuelle. Cependant, les antibiotiques ont un effet délétère pour le microbiote intestinal. En effet, la prise de ce type de traitement entraîne une perte de la richesse des espèces bactériennes, notamment par la diminution des populations de bactéries commensales, mais également un risque de développement de bactéries résistantes aux antibiotiques, potentiellement pathogènes³¹⁸. Plusieurs types d'antibiotiques sont utilisés, la plupart sont à large spectre, c'est-à-dire qu'ils ont une action non-spécifique à une espèce bactérienne et éliminent un grand nombre de bactéries, pathogènes comme commensales. L'ampicilline, la ciprofloxacine, les tétracyclines, la clarithromicine, la vancomycine et le métronidazole sont les antibiotiques les plus couramment utilisés, leur mécanisme d'action pouvant varier. La vancomycine élimine les bactéries Gram+, tandis que le métronidazole s'attaque aux bactéries anaérobies. Des études ont démontré que l'administration de ces deux antibiotiques ne change pas ou diminue temporairement la densité du microbiote (quantité de micro-organismes le composant)^{319,320}. Cependant, la diversité globale du microbiote après utilisation d'antibiotiques est fortement diminuée, cet effet pouvant durer jusqu'à 2 ans après la prise du traitement³²¹.

La prise d'antibiotiques peut induire la perte permanente de bactéries abondamment présentes dans le microbiote avant le traitement, et l'augmentation de bactéries faiblement présentes, voire indétectables, avant la prise d'antibiotiques^{320,322}. Les personnes âgées et les enfants en bas âge, spécifiquement durant leur première année de vie, possèdent un microbiote très sensible à l'effet des antibiotiques. Ils ont plus de risque de voir apparaître des

pathologies (infection, développement d'asthme et d'allergies) suite à la prise d'antibiotiques^{323,324}. Aux antibiotiques utilisés en médecine s'ajoutent ceux utilisés en agriculture animale, que nous assimilons également par l'alimentation. Peu d'études ont été faites à ce sujet, cependant, certains projets émergents afin de limiter l'utilisation d'antibiotiques en élevage pour limiter l'impact sur la santé des consommateurs.

Les lavages et les laxatifs, couramment utilisés pour la préparation à une coloscopie, ont également un effet sur la composition du microbiote. L'utilisation de polyéthylène glycol (PEG) induit une perte de mucus et l'évacuation des bactéries luminales, conduisant à une altération de la richesse du microbiote³²⁵.

Autres hypothèses (génétique, théorie hygiéniste)

D'autres hypothèses existent pour expliquer le changement de microbiote, la théorie de l'impact génétique de l'hôte qui pourrait influencer la composition du microbiote ou encore la théorie hygiéniste, qui évoque la possibilité que l'aseptisation de notre environnement amoindrisse la diversité microbienne.

L'étude de l'impact du génome sur le microbiote a été possible grâce à l'analyse des microbiotes de jumeaux monozygotes, notamment par une étude sur 1 126 paires de jumeaux au Royaume-Uni, qui a découvert plusieurs loci génétiques corrélés à l'abondance dans certains types de bactéries dans les fèces³²⁶. Le locus *LCT*, codant pour la lactase (enzyme capable d'hydrolyser le lactose), est lié à la présence du genre *Bifidobacterium* dans les fèces. En effet, chez certains individus, la perte de ce gène induit une intolérance au lactose, qui ne peut plus être digéré par l'hôte et qui va donc être consommé par les Bifidobacteria, augmentant de ce fait leur population. La population du genre *Akkermansia* est quant à elle corrélée à la présence du locus *SIGLEC15*, qui code pour une lectine se liant à l'acide sialique, impliquée dans la détermination du soi et du non-soi. L'abondance du genre *Blautia* est influencée par le locus *CD36*, qui joue un rôle dans la promotion de l'absorption d'acides gras à chaîne longue par l'intestin. Enfin, le locus *ALDH1L1*, codant pour l'aldéhyde déshydrogénase (importante pour l'oxydation du formate), impacte la population de l'ordre SHA-98, appartenant à la famille des *Christensenellaceae*. L'analyse des microbiotes de jumeaux monozygotes apporte beaucoup d'éléments de réponse sur le lien entre la génétique humaine et la composition du microbiote. Cependant, l'étude des microbiotes chez des jumeaux monozygotes discordants (l'un avec la maladie de Crohn, l'autre sans maladie) ou

chez des frères ou sœurs de personnes atteintes par une MICI, créé de nouvelles questions à propos de l'impact génétique et microbienne sur le développement de pathologies inflammatoires intestinales. L'étude de jumeaux discordants a démontré que les deux individus ne possédaient pas le même microbiote, appuyant la thèse du microbiote à l'origine de la pathogenèse, mais allant à l'inverse des résultats sur l'impact de la génétique sur le microbiote et sur la pathogenèse³²⁷. Tandis que dans une autre étude, sur la fratrie de personnes atteintes de la maladie Crohn, les résultats montrent que les fratries saines et l'individu malade partagent les mêmes signes de dysbiose³²⁸. En effet, le « noyau » de leur microbiote, c'est-à-dire leur microbiote dominant, était moins diversifié que le microbiote des contrôles sains non apparentés. De plus, la population de *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérie commensale importante pour l'homéostasie intestinale, est diminuée chez les malades et leur fratrie.

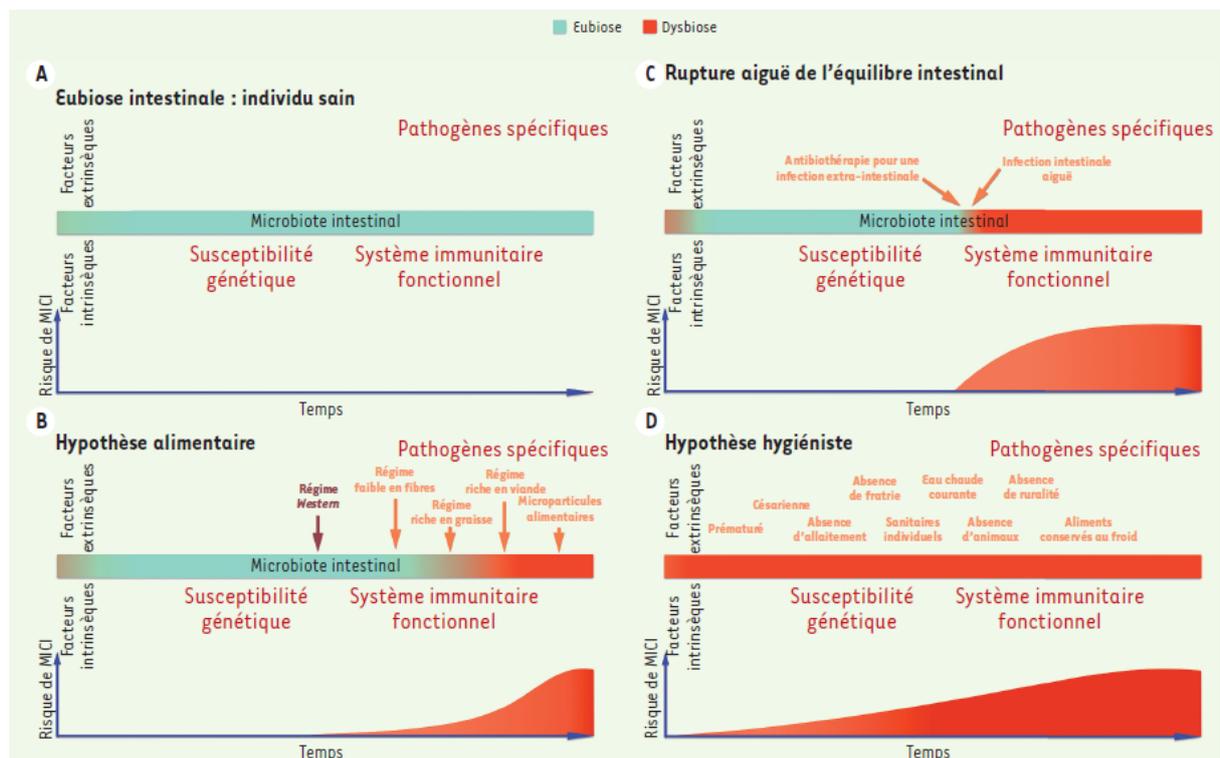


Figure 36 : Représentations schématiques de 4 causes exogènes de dysbiose intestinale humaine³²⁹
 A : Microbiote sain ; B : Microbiote et régime alimentaire occidental ; C : Microbiote sous ATB ; D : Hypothèse hygiéniste

La théorie de l'hygiène, ou hypothèse hygiéniste, évoque l'implication de l'augmentation de l'hygiène chez l'enfant et son environnement dans l'apparition de pathologies auto-immunes. Autre signe de l'occidentalisation (comme le régime alimentaire), l'amélioration des conditions d'hygiène et d'assainissement implique plusieurs facteurs qui vont mener à

l'absence de bactéries dans notre environnement, limitant l'exposition à des agents infectieux durant l'enfance. Cette absence de variété dans les micro-organismes en contact avec l'enfant induirait une absence d'éducation de son système immunitaire, le rendant moins tolérant aux micro-organismes et pouvant mener à une réponse immunitaire exagérée en présence de nouveaux antigènes bactériens. La qualité de l'eau (filtrée et aseptisée), l'hygiène domestique et personnelle, les réglementations sanitaires liées à l'alimentation, mais aussi le milieu de vie (rural ou urbain) et le contact avec des animaux domestiques durant l'enfance, ces multiples facteurs pourraient influencer le microbiote, moduler sa diversité et ainsi, conduire à un mauvais développement du système immunitaire. Des études sur des cohortes de familles ont analysé l'incidence des pratiques d'hygiène sur l'apparition de pathologies inflammatoires (MICI). Certaines d'entre elles ont démontré l'impact de facteurs, tels que la taille de la famille ou le manque de contact d'enfants en bas âge avec des animaux domestiques, au développement de MICI chez leurs membres^{330,331}. D'autres ont, au contraire, démontré qu'il n'existe pas de corrélation entre les habitudes en termes d'hygiène des familles et l'apparition de pathologies auto-immunes³³².

ANNEXE 2 : TRAITEMENT DE LA PRD PAR LA THERAPIE CELLULAIRE

L'étude de l'utilisation de la thérapie cellulaire en clinique est en plein essor depuis une dizaine d'années. La thérapie cellulaire est une stratégie thérapeutique qui consiste à transplanter des cellules saines et vivantes, souches ou différenciées, pour traiter une maladie. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) induisent de nombreux effets thérapeutiques dans différentes pathologies. Leur action trophique et leur capacité régénérative font d'elles un candidat prometteur pour agir sur les atteintes colorectales radio-induites. En effet, les CSM possèdent de nombreuses capacités qui leur permettraient de réguler les altérations intestinales radio-induites, telles que la sécrétion de molécules aux actions pro-prolifératives, anti-oxydantes et anti-apoptotiques, ainsi que l'immunomodulation des cellules immunitaires innées et adaptatives.

1. Utilisation clinique des CSM

De nombreuses études cliniques étudient l'utilisation des CSM pour traiter des pathologies diverses. En 2019, 856 études cliniques sont recensées sur l'utilisation de CSM dans des maladies variées (recherche effectuée sur le site clinicaltrials.gov avec les termes « mesenchymal stem cells », « mesenchymal stromal cells » ou « msc » le 25/07/2019). Le nombre d'études a considérablement augmenté au fil des années, 524 études étaient menées en 2016 et environ 200 en 2012.

Les CSM utilisées en clinique sont autologues (provenant du patient) ou allogénique (provenant d'une autre personne que le patient) et sont injectées localement ou par voie intraveineuse. La principale source de CSM en clinique est la moelle osseuse, mais d'autres études utilisent les CSM provenant de cordon ombilical ou de tissu adipeux. Les CSM adipeuses présentent de nombreux avantages, elles sont plus faciles à obtenir car la pratique de récupération est mini-invasive (la liposuccion est utilisée en routine, dans les services de chirurgie plastique notamment). La quantité de CSM est également plus importante, de 100 à 500 fois, dans le tissu adipeux que dans la moelle osseuse ou le cordon ombilical^{333,334}, de plus leur amplification *in vitro* est plus rapide.

Dans le cadre d'un traitement clinique de pathologies inflammatoires intestinales, les CSM constituent une thérapie idéale, grâce à leurs effets immunosuppresseurs et pro-régénérants. Plusieurs études démontrent l'intérêt d'utiliser les CSM dans le cadre d'un traitement pour les

MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, réfractaires aux traitements habituels. Les MICI sont les pathologies qui se rapprochent le plus de la PRD. En effet, ces deux types de pathologies possèdent différentes caractéristiques similaires comme l'inflammation chronique et les altérations du tissu. Ainsi, les études cliniques de l'utilisation des CSM pour traiter les MICI apportent de nouvelles données sur la potentielle efficacité clinique des CSM dans le cadre d'un traitement pour la PRD. Les effets les plus intéressants sont ceux des CSM pour traiter les fistules périanales liées à la maladie de Crohn (voir tableau 13). Les essais cliniques effectués sur l'utilisation des CSM pour traiter les fistules anales liées à la maladie de Crohn ont tous utilisés une injection locale des CSM. Les CSM utilisées étaient autologues ou allogéniques et provenaient de moelle osseuse (BM-CSM) ou de tissu adipeux (ad-CSM). Peu d'effets secondaires sévères ont été associés à ces études, suggérant une bonne tolérance du traitement par les patients.

Des études cliniques ont également été faites sur les pathologies inflammatoires intestinales (Crohn et rectocolite) pour traiter les lésions luminales, c'est-à-dire les lésions présentes sur la surface de la muqueuse (voir tableau 14).

Toutes les études analysées ont utilisé des CSM provenant de moelle osseuse, autologue ou allogénique, qui ont été injectées par voie intraveineuse. Les effets thérapeutiques observés ont été moins probants que ceux des études sur les fistules anales. De graves effets secondaires possiblement reliés à l'injection de CSM ont notamment été reportés, tels que l'aggravation de la maladie de Crohn ou une infection par la bactérie pathogène *Clostridium difficile*. Cependant, certaines études ont démontré une rémission complète chez les patients traités par les CSM, une amélioration endoscopique et une amélioration de la qualité de vie, prouvant ainsi une efficacité des CSM pour traiter ce type de pathologie.

Ces résultats cliniques, notamment l'utilisation des CSM dans le cas de maladie de Crohn fistulisée, mettent en lumière l'efficacité thérapeutique que pourraient avoir ces cellules dans un autre cas de lésions colorectales sévères, comme la PRD. Grâce à des résultats encourageants provenant de notre laboratoire au début des années 2000 sur l'efficacité des CSM à traiter les lésions radio-induites, majoritairement lors d'un syndrome hématopoïétique ou gastro-intestinal radio-induits, l'équipe a pu envisager l'utilisation de la thérapie par les CSM pour traiter les lésions radio-induites sévères, notamment lors d'un traitement compassionnel suite à un surdosage en radiothérapie pelvienne.

| Année/ Auteurs | Pathologie | n | Phase | Traitement | Effets observés |
|--|------------------------------------|------------|--------------|--|--|
| 2005 Garcia-Olmo D et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 4 | I | ad-CSM, autologue, injection loc. | - 3/4 fistule cicatrisée - 1/4 fermeture partielle de la fistule - Pas d'effet secondaire observé |
| 2009 Garcia-Olmo D et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 49 | IIb | ad-CSM (dans fibrine), autologue, injection loc. | - 17/24 fistule cicatrisée, effet maintenu chez 7/12 des patients 40 mois plus tard - Amélioration qualité de vie - Pas d'effet secondaire observé |
| 2011 Ciccocioppo R et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 10 | I | BM-CSM, autologue, injection loc. | - 7/10 fistule cicatrisée + diminution activité maladie + cicatrisation muqueuse rectale - 3/10 fermeture partielle de la fistule - Pas d'effet secondaire observé pendant procédure ou le suivi durant les 12 mois |
| 2013 Cho YB et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 10 | I | ad-CSM, autologue, injection loc. | - 3/10 fistule cicatrisée, effet maintenu 8 mois plus tard - 7/10 fermeture partielle de la fistule, effet maintenu 8 mois plus tard - Pas d'effet secondaire observé |
| 2013 Lee WY et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 43 | II | ad-CSM (dans fibrine), autologue, injection loc. | - 27/42 cicatrisation complète, effet maintenu 1 an plus tard chez 23/26 - 6/42 fermeture partielle de la fistule - Pas d'effet secondaire observé |
| 2013 De La Portilla F et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 24 | I/IIa | ad-CSM, allogénique, injection loc. | - 1 ^{ère} injection : Amélioration fistule chez 12/20 des patients, 9/13 après 2 ^e injection - Suivi durant 6 mois : 4 effets secondaires (3 abcès anaux et 1 léiomyome utérin) |
| 2015 Molendijk I et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 21 | IIa | BM-CSM, allogénique, injection loc. | - Rémission pour 8/15 patients traités après 6 sem., 7/15 après 12 sem., effet maintenu 24 sem. plus tard |
| 2016 Panes J et al. | Maladie de Crohn fistulisée (anal) | 212 | III | ad-CSM, allogénique, injection loc. | - 53/107 cicatrisation complète (36/105 placebo), effet plus rapide chez patients traités + Diminution activité maladie - 17,5% des patients traités présentent des effets secondaires (29,4% placebo) : abcès anal ou proctalgie |

Tableau 13 : Utilisation clinique des CSM dans le cas de la maladie de Crohn fistulisée³³⁵

| Année/ Auteurs | Pathologie | n | Phase | Traitement | Effets observés |
|--|-------------------------------|-----------|-----------|---|---|
| 2010 Duijvestein M et al. | Maladie de Crohn | 9 | I | BM-CSM, autologue, injection IV | - Réponse clinique chez 3/9 des patients traités mais pas de rémission clinique - Aggravation de la maladie pour 4/9 |
| 2016 Dhere T et al. | Maladie de Crohn | 12 | I | BM-CSM, autologue, injection IV | - Réponse clinique chez 5/11 des patients traités 2 sem. après injection - Aggravation maladie Crohn chez 5 patients - Graves effets secondaires possiblement reliés à l'injection : 1 Colite et appendicite sévère et 1 infection au <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> |
| 2006 Onken J et al. | Maladie de Crohn | 9 | II | BM-CSM, allogénique, injection IV | - Réponse clinique chez 3/9 patients traités, rémission clinique chez 1/9 - Amélioration qualité de vie - 5/9 patients a eu des effets secondaires modérés |
| 2012 Liang J et al. | Maladie de Crohn et RCH | 7 | I | BM-CSM, allogénique, injection IV | - Diminution activité de la maladie chez 7/7, rémission clinique chez 5/7 - Amélioration endoscopique chez 3/7 - Diminution taille fistule chez 1/9 - Diminution étendue de la zone inflammée et de l'infiltration lymphocytaire dans le tissu - Pas d'effet secondaire grave reporté |
| 2014 Forbes GM et al. | Maladie de Crohn | 15 | II | BM-CSM, allogénique, injection IV | - Réponse clinique chez 12/15, rémission clinique chez 8/15 - Amélioration endoscopique chez 7/15 - Amélioration qualité de vie |

Tableau 14 : Utilisation clinique des CSM dans le cas des MICI lumineales³³⁵

Entre 2001 et 2006, 433 patients atteints par un cancer de la prostate et traités par radiothérapie pelvienne au centre d'Epinal ont reçu un surdosage de rayons ionisants lors de leur protocole de traitement. Durant les années qui suivirent cet accident, 32 de ces patients ont vu apparaître des symptômes sévères liés à l'irradiation d'organes de la zone pelvienne (rectite et cystite hémorragiques, fistules, sténose rectale). Neuf patients sont décédés, dont l'un suite aux lésions radio-induites dont il souffrait. En 2008, trois patients présentant des lésions rectales sévères ont reçu une thérapie par BM-CSM allogéniques en tant que traitement compassionnel^{336,337}. Un quatrième patient a également été traité par CSM en 2012. L'administration de cellules par voie systémique, répétée ou non, a été bien tolérée et des effets analgésiques et anti-inflammatoires ont été observés. De plus, le traitement a réduit les hémorragies intestinales. Enfin, la qualité de vie de ces patients s'est vue améliorée par l'injection de CSM. Pour trois de ces quatre patients, l'effet de cette thérapie a été transitoire, les symptômes ont progressivement réapparus dans les mois suivants l'injection de CSM, mais cette thérapie a également permis de stabiliser l'état de santé d'un des quatre patients. Cette première tentative de traitement des effets radio-induits sur la zone colorectale par les CSM a été un succès. Dans un premier temps, l'effet thérapeutique des CSM a été démontré dans le cas de la PRD sévère, bien que l'amélioration des symptômes soit transitoire pour la plupart des patients. Dans un second temps, cette étude clinique a permis d'aider à définir les modalités d'administration des cellules, par exemple le nombre d'injections, à quelle fréquence et la quantité de cellules à injecter.

Une étude clinique de phase II, intitulée PRISME, est actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de l'injection systémique de CSM pour traiter les complications sévères et chroniques abdomino-pelviennes induites par radiothérapie, réfractaires aux thérapies standards. Une douzaine de patients sont recrutés pour cette étude. Ces patients doivent être atteints de complications rectale et/ou cystique d'un grade supérieur à 2 sur l'échelle de LENT SOMA et avoir répondu négativement à au moins trois traitements conventionnels. Trois injections espacées d'une semaine seront effectuées et les patients seront suivis jusqu'à 4 mois après l'injection. Quatre objectifs ont été fixés afin d'évaluer l'efficacité de la thérapie. L'objectif principal de cette étude est la diminution d'un grade sur l'échelle LENT SOMA des hémorragies rectales et/ou urinaires. Les objectifs secondaires sont : la diminution de la consommation de médicaments analgésiques (opiacés), l'amélioration de la qualité de vie (2 questionnaires : SF36 et HADS), la diminution de la douleur (évaluation de la douleur ressentie) et la diminution de la fréquence des diarrhées.

Le laboratoire de radiobiologie des expositions médicales (LRMed) de l'IRSN s'est donné pour objectif depuis plusieurs années de développer la thérapie cellulaire par les CSM dans des modèles pré-cliniques d'irradiation colorectale. Les modèles animaux utilisés permettent d'obtenir des lésions similaires à celles observées chez les patients atteints par la PRD. Ainsi, de nombreux effets et mécanismes des CSM sur l'inflammation, la régénération tissulaire ont pu être découverts, démontrant l'intérêt de leur utilisation pour traiter cette pathologie.

2. Etudes pré-cliniques de la thérapie par CSM dans un modèle de PRD

a. Régénération de l'épithélium

Plusieurs études ont prouvé que les CSM peuvent améliorer les altérations fonctionnelles et tissulaires coliques causées par les rayons ionisants (voir tableau 15). Plusieurs types de CSM sont analysées, de moelle osseuse (BM-CSM), de cordon ombilical (UC-CSM) de tissu adipeux (ad-CSM) ou encore issus du placenta (PD-CSM). Les études portent sur des traitements par CSM allogènes mais également xénogènes (provenant d'un individu d'une autre espèce, dans le cas présent des CSM humaines dans un modèle animal). Une publication étudie l'effet d'une injection intra-péritonéale, tandis que les autres étudient l'efficacité d'un traitement par voie intraveineuse. Différents modèles animaux sont utilisés : souris, rat et porc. Les protocoles d'irradiation sont également multiples, irradiation abdominale, colorectale, rectale ou corps entier, les doses d'irradiation variant en fonction des études (Voir tableau 8).

De manière générale, les articles démontrent la capacité des CSM à augmenter la survie et la prise de poids, et à améliorer le score lésionnel des animaux irradiés. Les fonctions de sécrétion et d'absorption intestinale^{338,339}, ainsi que les fonctions de contraction de la couche musculaire²², sont maintenues grâce au traitement par CSM. L'épaisseur de la muqueuse intestinale ou colique (en fonction de l'organe étudié) est augmentée par l'injection de CSM.

L'état de renouvellement est maintenu grâce à l'augmentation de la prolifération et du nombre de cellules souches intestinales (Lgr5+^{338,340}, Bmi1+³⁴¹ et Musashi-1³⁴²) et coliques (SOX9+²⁵⁸), mais également grâce à la diminution de l'apoptose radio-induite^{339,340,342}. Le maintien des cellules différenciées est également assuré par l'injection de CSM, notamment les entérocytes (Vil1+³⁴⁰) et les cellules de Paneth dans l'intestin (lysozyme+^{340,342}) et les cellules calciformes²⁵⁸. Enfin, les jonctions serrées (ZO-1 et occludin-1)³⁴² et adhérentes (β -caténine)²⁵⁸ sont préservées après traitement par CSM.

A ces résultats sur la structure épithéliale s'ajoutent l'observation d'une diminution de la fibrose radio-induite au niveau rectal et colorectal²². En effet, le traitement par CSM induit une réduction du dépôt de collagène, associée à une diminution de l'expression de col3a1, col1a1 et col1a2, des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, et de l'expression de MIMPs et de TIMPs dans le tissu³⁴³.

Enfin, l'injection de CSM permet également de stimuler l'angiogenèse. Une augmentation de la densité microvasculaire intestinale est observée³⁴¹, ainsi que l'augmentation de l'expression de facteurs impliqués dans ce processus tels que VEGF, bFGF, Flk1, et Angiopoïétine 1 et 2³⁴³.

Ces modèles animaux ont également participé à identifier les mécanismes impliqués dans les propriétés régénératrices des CSM, comme la mobilisation des CSM endogènes et la production de facteurs de croissances.

L'équipe de Saha *et al.* a démontré, grâce à un modèle murin d'irradiation abdominale traité par injection de BM-CSM allogéniques, l'augmentation de la population de CSM endogènes dans la lamina propria intestinale³³⁸. Ces cellules endogènes, participant à l'établissement de la niche des cellules souches, jouent un rôle important dans la régénération intestinale³⁴⁴, notamment par la sécrétion de PGE2, capable d'inhiber l'apoptose radio-induite³⁴⁵ et d'induire la signalisation WNT des cellules souches³⁴⁶. Cet article démontre également l'augmentation des niveaux de facteurs de croissance R-spondin1, FGF2, KGF, PDGF-B et EGF dans le sérum, impliqués dans la prolifération épithéliale, endothéliale et myofibroblastique.

Une étude publiée en 2013, menée par Sémont *et al.*, a montré une réparation des lésions colorectales radio-induites dans un modèle rat grâce à l'injection de BM-CSM allogéniques²⁵⁸. La mobilisation des cellules stromales endogènes est observée après traitement par CSM. En effet, l'injection de CSM augmente les niveaux de SDF-1 α plasmatiques, traduisant une mobilisation des CSM endogènes, appelées à prendre le relais des CSM injectées pour continuer la régénération tissulaire après leur élimination. De plus, après injection de CSM, l'expression de WNT4 augmente dans les cellules épithéliales, traduisant une action des CSM sur la régénération épithéliale par la voie de signalisation WNT non canonique.

| Année/Auteurs | Modèle | Type CSM | Administration | Résultats |
|--|--|---|---|---|
| 2010 A. Sémont et al. ³³⁹ | n=6-8 Souris NOD/SCID Irradiation corps entier 3.5Gy puis irradiation abdominale 5Gy | BM-CSM humaines | Injection IV de 5x10 ⁶ cell. par animal 24h après irradiation Euthanasie : 3, 15, 30, 60, 90 et 120 jours après irradiation | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la survie des animaux traités - Restauration de l'intégrité de l'intestin par les CSM 3j après IRR : -> Structurelle : Augmentation épaisseur de la muqueuse, diminution de l'apoptose et augmentation de la prolifération des cellules épithéliales -> Fonctionnelle : Amélioration des fonctions sécrétoires et d'absorption |
| 2011 S. Saha et al. ³³⁸ | n=25 (?) Souris C57B/6 Irradiation abdominale (16 à 20Gy) | BM-CSM murines | Injection IV de 2x10 ⁶ cell. par animal 24h ou 72h après irradiation Euthanasie : 1, 3.5 et 7 jours après irradiation | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la survie des animaux traités - Régénération structurelle de l'intestin par les CSM 3.5j après IRR : Augmentation taille et nombre des cryptes, augmentation de la prolifération épithéliale, survie et croissance des cellules Lgr5+ (cellules souches) - Amélioration fonctionnelle de l'intestin par les CSM 7j après IRR : Amélioration de la capacité d'absorption du xyllose - Augmentation du nombre de fibroblastes et macrophages sub-épithéliaux dans la lamina propria (3.5j après IRR) - Augmentation des niveaux de R-spondin 1, FGF2, PDGF-B, KGF, IL-6 et IL-10 et diminution des niveaux d'IL-12 et IL-17 dans le sérum par les CSM 1j après IRR - Augmentation quantités ARN de FGF10, FGF2, EGF et IL-10 dans les cryptes |
| 2012 Z. Gao et al. ³⁴⁷ | n=10 Souris BALB/C Irradiation abdominale (8,5 ou 10Gy) | UC-CSM humaines et leur milieu de culture | Injection IV de 10 ⁶ cell. ou 200µL SN par animal, immédiatement après l'irradiation Euthanasie : 1, 3, 7, 11, 21, 30 et 60 jours après irradiation | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la survie à 10Gy des animaux traités - Diminution de l'occurrence de diarrhées et ralentissement de la perte de poids à 10Gy par les CSM - Augmentation épaisseur de la muqueuse par SN de CSM à 8.5Gy au fil du temps |
| 2013 A. Sémont et al. ²⁵⁸ | n=8 Rat Sprague Dawley Irradiation colorectale 27Gy | BM-CSM de rat | Injection IV de 5x10 ⁶ cell. par animal immédiatement après irradiation (préventif) ou 3 semaines plus tard (curatif), puis toutes les 2 semaines (itératif) Euthanasie : 2, 8 ou 21 semaines après irradiation | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la mobilisation des CSM endogènes 1 semaine après injection préventive - Réduction de l'ulcère et ré-épithélisation (injection préventive, 2 semaines après injection) : -> Augmentation nombre et taille des cryptes et nombre de crypt-branching, augmentation des jonctions adhérentes (β-caténine), maintien du contenu des cellules caliciformes, augmentation de la prolifération épithéliale, du nombre de cellules souches SOX9+ et de l'expression colique de WNT4 - Amélioration après traitement curatif itératif (8 et 21 semaines après IRR) : -> Augmentation de la survie des animaux, diminution des zones nécrotiques, diminution des hémorragies, amélioration musculaire, vasculaire et du score histologique, augmentation de la prolifération, du marquage SOX9 et WNT4 (8s) |
| 2013 P. Chang et al. ³⁴¹ | n=9 Rat Sprague Dawley Irradiation abdominale 15Gy | Ad-CSM humaines | Injection IP de 5x10 ⁶ cell. par animal 2h après irradiation Euthanasie : 5, 10 ou 30 jours après irradiation | <ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de la survie et de la prise de poids des animaux traités - Diminution infiltration des neutrophiles par les CSM 10 jours après IRR - Augmentation du taux d'IL-10 dans le sérum par les CSM 5 jours après IRR - Augmentation de la néovascularisation par les CSM 10 jours après IRR : Augmentation densité microvasculaire et des taux d'ARN de VEGF, BFGF et Flk1 dans l'intestin - Augmentation de la taille des villosités, de la prolifération et du nombre de cellules souches (Bmi1+) par les CSM 10 jours après IRR - Augmentation du taux d'ARN d'EGF dans l'intestin par les CSM 10 jours après IRR |

Tableau 15 : Utilisation pré-clinique des CSM dans le cas de lésions intestinales et colorectales radio-induites^{19,22,258,338-343,347}

| Année/Auteurs | Modèle | Type CSM | Administration | Résultats |
|--|---|--------------------|--|--|
| 2013 C. Linard et al. ³⁴³ | n=3 Porc Göttingen Irradiation rectale ~25Gy | BM-CSM porcines | Injection IV de 2x10 ⁶ cell. par kg 27, 34 et 41 jours après irradiation (itératif) Euthanasie : 49 jours après irradiation | - Amélioration score fèces (solidité, présence de sang) des animaux traités - Diminution étendue fibrose et de l'épaisseur de la couche musculaire 1 semaine après 2 ^e injection CSM (observation coloscopique) - Diminution expression TNF α , IL-6 et IL-8 et augmentation expression IL-10 et Foxp3 dans la muqueuse rectale (RT-PCR) - Diminution nombre macrophages et expression MCP-1 dans la muqueuse rectale et colique - Diminution expression iNOS et augmentation expression CD163 dans muqueuse rectale - Diminution de la fibrose rectale : Diminution expression TGF β , col1a2 et col3a1 et augmentation expression KGF dans muqueuse rectale + Diminution expression MMPs et TIMPs dans rectum (RT-PCR) - Augmentation expression VEGF, angioïpéine 1 et 2, FGF2 et PDGF dans rectum, augmentation expression eNOS, VEGF, VEGFR1 et PDGF dans colon (RE-PCR) - Diminution score lésionnel épithélial des animaux traités 21 jours après IRR : Diminution zones ulcérées, augmentation des cryptes régénérantes et de la prolifération épithéliale - Pas d'effet sur le score à 28 jours après IRR et CSM - Pas de diminution de l'infiltrat neutrophiles, macrophages et mastocytes après CSM (7, 21 ou 28 jours après IRR) - Pas de diminution expression colique IL-1 β , MIP-2 et IL-8 par les CSM - Diminution activation et prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8, augmentation apoptose CD8 proliférants par les CSM - Pas d'augmentation de la population de Treg par les CSM 21 jours après IRR - Augmentation production de corticostéroïde par muqueuse colique après traitement CSM à 21 jours après IRR + augmentation expression colique de HSD11b1 |
| 2014 R. Bessout et al. ¹⁹ | n=6 Rat Sprague Dawley Irradiation colorectale 27Gy | BM-CSM de rat | Injection IV de 5x10 ⁶ cell. par animal immédiatement après l'irradiation Euthanasie : 7, 21 ou 28 jours après irradiation | - Diminution du score histologique de sévérité lésionnel - Amélioration des fonctions musculaires : Restauration de la capacité de contraction - Réduction du dépôt de fibres de collagène sur la lésion et diminution de l'expression d'enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire (Col1a1 et Col3a1) - Diminution des populations de lymphocytes T CD4 dans le colon et le sang - Diminution des populations de Treg dans le colon - Diminution des populations de Th17 et de la sécrétion d'IL-17 dans le colon - Amélioration de la survie des animaux à 14 et 16Gy - Préservation de l'architecture cryptes/villosités de l'intestin des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR à la dose de 14Gy - Amélioration de la réparation de la muqueuse intestinale des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR, 14Gy : - - Augmentation des populations de cellules Lgr5+, augmentation des cellules Ki67+, Villin+ et lysozyme+ - Diminution de l'apoptose intestinale des animaux traités à 6h après IRR, 14Gy - Augmentation expression intestinale Wnt3a, IGF-1, HGF, bFGF, TGF β 1, VEGF (RT-PCR), augmentation du Wnt3a et β -caténine (Western Blot) à 3.5 jours après IRR - Augmentation poids de l'intestin des animaux traités - Diminution score pathologique de l'intestin : Maintien de la structure des villosités et inflammation modérée de l'intestin des animaux traités - Augmentation populations CD31 (cellules endothéliales), EGFR et Ki67+ (cellules proliférantes), lysozyme+ (cellules Paneth) et Musashi-1 (cellules souches) des animaux traités - Diminution de l'apoptose (TUNEL) - Augmentation des jonctions serrées ZO-1 et occludin-1 (histologie et Western Blot) - Diminution expression intestinale TNF α , IFN γ et IL-6 (RT-PCR) et iNOS et COX2 (Western Blot) |
| 2015 R. Bessout et al. ²² | n=8 Rat Sprague Dawley Irradiation colorectale 27Gy | ad-CSM de rat | Injection IV de 5x10 ⁶ cell. par animal 3 semaines après l'irradiation Euthanasie : 4 semaines après irradiation | - Amélioration de la survie des animaux à 14 et 16Gy - Préservation de l'architecture cryptes/villosités de l'intestin des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR à la dose de 14Gy - Amélioration de la réparation de la muqueuse intestinale des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR, 14Gy : - - Augmentation des populations de cellules Lgr5+, augmentation des cellules Ki67+, Villin+ et lysozyme+ - Diminution de l'apoptose intestinale des animaux traités à 6h après IRR, 14Gy - Augmentation expression intestinale Wnt3a, IGF-1, HGF, bFGF, TGF β 1, VEGF (RT-PCR), augmentation du Wnt3a et β -caténine (Western Blot) à 3.5 jours après IRR - Augmentation poids de l'intestin des animaux traités - Diminution score pathologique de l'intestin : Maintien de la structure des villosités et inflammation modérée de l'intestin des animaux traités - Augmentation populations CD31 (cellules endothéliales), EGFR et Ki67+ (cellules proliférantes), lysozyme+ (cellules Paneth) et Musashi-1 (cellules souches) des animaux traités - Diminution de l'apoptose (TUNEL) - Augmentation des jonctions serrées ZO-1 et occludin-1 (histologie et Western Blot) - Diminution expression intestinale TNF α , IFN γ et IL-6 (RT-PCR) et iNOS et COX2 (Western Blot) |
| 2016 W. Gong et al. ³⁴⁰ | n=10 Souris C57Bl/6 Irradiation abdominale (12, 14 ou 16Gy) | BM-CSM murines | Injection IV de 10 ⁶ cell. par animal 2h après irradiation Euthanasie : 3.5 ou 5 jours après irradiation | - Amélioration de la survie des animaux à 14 et 16Gy - Préservation de l'architecture cryptes/villosités de l'intestin des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR à la dose de 14Gy - Amélioration de la réparation de la muqueuse intestinale des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR, 14Gy : - - Augmentation des populations de cellules Lgr5+, augmentation des cellules Ki67+, Villin+ et lysozyme+ - Diminution de l'apoptose intestinale des animaux traités à 6h après IRR, 14Gy - Augmentation expression intestinale Wnt3a, IGF-1, HGF, bFGF, TGF β 1, VEGF (RT-PCR), augmentation du Wnt3a et β -caténine (Western Blot) à 3.5 jours après IRR - Augmentation poids de l'intestin des animaux traités - Diminution score pathologique de l'intestin : Maintien de la structure des villosités et inflammation modérée de l'intestin des animaux traités - Augmentation populations CD31 (cellules endothéliales), EGFR et Ki67+ (cellules proliférantes), lysozyme+ (cellules Paneth) et Musashi-1 (cellules souches) des animaux traités - Diminution de l'apoptose (TUNEL) - Augmentation des jonctions serrées ZO-1 et occludin-1 (histologie et Western Blot) - Diminution expression intestinale TNF α , IFN γ et IL-6 (RT-PCR) et iNOS et COX2 (Western Blot) |
| 2017 Y.M. Han et al. ³⁴² | n=8 Souris C57Bl/6 Irradiation corps entier 7Gy | PD-CSM humaines | Injection IV de 10 ⁶ cell. par animal (itératif) 3 injections après IRR (J1, J4 et J7) Euthanasie : 10 jours après irradiation | - Amélioration de la survie des animaux à 14 et 16Gy - Préservation de l'architecture cryptes/villosités de l'intestin des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR à la dose de 14Gy - Amélioration de la réparation de la muqueuse intestinale des animaux traités à 3.5 et 5 jours après IRR, 14Gy : - - Augmentation des populations de cellules Lgr5+, augmentation des cellules Ki67+, Villin+ et lysozyme+ - Diminution de l'apoptose intestinale des animaux traités à 6h après IRR, 14Gy - Augmentation expression intestinale Wnt3a, IGF-1, HGF, bFGF, TGF β 1, VEGF (RT-PCR), augmentation du Wnt3a et β -caténine (Western Blot) à 3.5 jours après IRR - Augmentation poids de l'intestin des animaux traités - Diminution score pathologique de l'intestin : Maintien de la structure des villosités et inflammation modérée de l'intestin des animaux traités - Augmentation populations CD31 (cellules endothéliales), EGFR et Ki67+ (cellules proliférantes), lysozyme+ (cellules Paneth) et Musashi-1 (cellules souches) des animaux traités - Diminution de l'apoptose (TUNEL) - Augmentation des jonctions serrées ZO-1 et occludin-1 (histologie et Western Blot) - Diminution expression intestinale TNF α , IFN γ et IL-6 (RT-PCR) et iNOS et COX2 (Western Blot) |

Tableau 15 (suite)

Gong *et al.* publient en 2016 des résultats démontrant que l'expression intestinale de facteurs de croissance, notamment de Wnt3a et de la β -caténine, est augmentée dans un modèle murin d'irradiation abdominale injecté avec des CSM allogéniques³⁴⁰. Cette observation appuie l'hypothèse de la capacité des CSM à activer la voie canonique Wnt/ β -caténine, impliquée dans la prolifération et le maintien des cellules souches intestinales. L'injection intraveineuse de Wnt3a dans le même modèle d'irradiation induit une diminution des lésions radio-induites, cependant cet effet est partiel en comparaison avec l'effet du traitement par CSM. Cette expérience démontre la nécessité de plusieurs molécules actives sécrétées par les CSM pour permettre une régénération épithéliale efficace après irradiation.

Une étude récente du laboratoire LRMed, menée par Moussa *et al.* (article soumis) et à laquelle j'ai participé lors de mon stage de fin d'études, a étudié l'effet *in vitro* des CSM sur des organoïdes coliques. Les résultats de cette étude démontrent la capacité des CSM à favoriser la formation d'organoïdes coliques et la prolifération des cellules souches coliques. Cet effet est lié à la découverte de la capacité des CSM à sécréter des éléments de la niche des cellules souches coliques, permettant de reproduire un micro-environnement optimal à la régénération épithéliale. Une forte expression génique codant pour des antagonistes de la voie BMP (Bone Morphogenic Protein) a été observée dans les CSM. La voie BMP est impliquée dans la différenciation des cellules souches et inhibe donc leur prolifération. Les antagonistes, nommés Grem-1 et Twsg-1, permettent de bloquer la voie BMP et par conséquent, maintiennent la prolifération des cellules souches. Les CSM endogènes, situées sous les cryptes coliques, expriment également ces antagonistes.

Bien que les résultats semblent démontrer une forte capacité des CSM à régénérer les tissus lésés par irradiation, Bessout *et al.* observent en 2014 dans leur modèle rat d'irradiation colorectale que le bénéfice thérapeutique des CSM sur la structure épithéliale n'est plus visible 28 jours après irradiation¹⁹. L'équipe suggère alors qu'une unique injection de CSM n'est pas suffisante pour traiter les lésions observées dans son modèle expérimental. Cette remarque est intéressante, compte tenu de l'élimination rapide des CSM lorsqu'elles sont injectées dans un milieu inflammatoire. Trois des études étudiées ici (Sémont 2013²⁵⁸, Linard³⁴³, Han³⁴²) effectuent des injections itératives de CSM et démontrent l'intérêt d'injections multiples, notamment dans des modèles d'irradiation à long terme, sur des lésions obtenues plusieurs semaines après l'exposition aux rayons ionisants, même si la réparation tissulaire reste partielle.

b. Immunomodulation par les CSM

Les CSM ont une action immunomodulatoire sur l'inflammation locale colorectale radio-induite. Ces publications ont permis de démontrer que l'injection de CSM dans un modèle expérimental de lésions intestinales/colorectales radio-induites permet d'agir sur différents niveaux d'inflammation.

Plusieurs articles publient des résultats sur la capacité des CSM à diminuer les taux de cytokines liées à l'inflammation en local ainsi qu'en systémique (voir tableau 16). De manière générale, on observe une diminution des cytokines IL-4, IL-8, IL-12, IL-17, TNF α et iNOS ainsi qu'une augmentation des cytokines IL-10 et Foxp3. L'IL-6 montre deux tendances différentes en fonction des articles, Saha *et al.* observent une augmentation de cette cytokine après traitement par CSM³³⁸, tandis que Linard *et al.*³⁴³ et Han *et al.*³⁴² remarquent une diminution. L'IL-6 est une cytokine au profil ambivalent, certaines études lui attribuent un lien avec la prolifération intestinal et la réparation des lésions^{348,349}, tandis que d'autres études la relie aux altérations intestinales dues à l'inflammation^{350,351}. Han *et al.* notent également une diminution de COX2 après traitement par CSM³⁴², ce qui pose quelques questions, puisque cette enzyme est généralement produite par les CSM et participe à la suppression de cellules immunitaires innées et adaptatives en activant dans la synthèse de PGE2^{22,352,353}. Il est possible que la provenance des CSM, dans le cas présent, du placenta, puisse induire une différence au niveau des molécules sécrétées.

| | Augmentation | Diminution |
|----------------------------|----------------|--|
| Saha et al (2013) | IL-6 IL-10 | IL-12 IL-17 |
| Chang et al (2013) | IL-10 | - |
| Linard et al (2013) | IL-10 Foxp3 | TNF α IL-6 IL-8 |
| Han et al (2017) | - | TNF α IL-4 IL-6 iNOS COX2 |

Tableau 16 : Modification de la sécrétion de cytokines par l'injection de CSM

Les effets des CSM sur les cellules de l'immunité innée varient en fonction des études. Saha *et al.* observent une augmentation des macrophages sub-épithéliaux suite au traitement par CSM³³⁸. La publication de Linard *et al.* montre une diminution de la population de macrophages dans le rectum, associé à une diminution de la chimiokine responsable du recrutement des macrophages par l'injection de CSM³⁴³. Bessout *et al.*, dans leur article de 2014, ne remarquent pas de différence dans le nombre de macrophages et de neutrophiles infiltrés dans la muqueuse colique après irradiation et suite au traitement par CSM¹⁹. Enfin, l'équipe de Chang *et al.* note une réduction de l'infiltrat de neutrophiles dans l'intestin après injection de CSM³⁴¹.

Plusieurs paramètres diffèrent entre ces études. Premièrement, les marqueurs histologiques de macrophages sont différents pour les trois études analysées. Saha *et al.* utilisent le marqueur F480/CD11b, Linard *et al.*, le marqueur MAC387 et Bessout *et al.*, le marqueur CD68. Chaque marqueur correspond à une population de macrophages distinctes : la sous-population de macrophages anti-inflammatoires recrutés et impliqués dans la réparation tissulaire (F480/CD11³⁵⁴), les macrophages récemment infiltrés (MAC387³⁵⁵) et les macrophages résidents (CD68). Deuxièmement, le protocole expérimental de chaque étude est également différent, l'organe étudié, la dose délivrée et le temps choisi après irradiation pour observer les lésions sont des paramètres variables en fonction des articles. Néanmoins, Saha *et al.* ont démontré l'importance des macrophages dans le processus de régénération intestinale *in vivo*, par la déplétion totale des populations de macrophages au clodronate. Suite à cette déplétion, la survie des animaux a drastiquement diminué (25% de survie) après irradiation et traitement par CSM, à une dose d'irradiation où 100% des animaux injectés aux CSM survivent normalement³³⁸.

Bessout *et al.* ont démontré que le traitement par CSM après irradiation colorectale permet d'obtenir un nombre et une prolifération de lymphocytes T CD4 et CD8 qui retournent à des niveaux contrôle¹⁹. Par un mécanisme paracrine, notamment en induisant la production de corticostérone par les cellules épithéliales, les CSM maintiennent un micro-environnement anti-inflammatoire qui module les populations de lymphocytes T. La différenciation et la prolifération des lymphocytes Th17 sont inhibées par les CSM, diminuant ainsi indirectement la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes Th17²². L'effet des CSM sur la population des lymphocytes Treg varie entre les deux articles de Bessout *et al.* (2014 et 2015). Dans leur article de 2014, l'injection de CSM n'induit pas de changement dans la population de Treg dans le côlon¹⁹, tandis que l'article de 2015 démontre une diminution de cette population²².

Les divergences à propos de la régulation de cette population spécifique par les CSM peut être liée au fait que les protocoles expérimentaux possèdent deux différences importantes : le temps d'injection des CSM et le temps d'observation après irradiation. Le premier article étudie l'effet d'une injection de CSM le jour même de l'irradiation sur des lésions observées 3 semaines après irradiation/injection. Le deuxième article analyse l'effet d'un traitement curatif par CSM 3 semaines après irradiation et observe les effets 4 semaines après irradiation et donc une semaine après l'injection. Il est possible que l'effet immunomodulateur des CSM sur les Treg soit observable à court terme après leur injection, étant donné que les CSM sont éliminées du tissu peu de temps après leur migration vers la zone lésée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Institut National du Cancer. Les Cancers en France - L'essentiel des faits et chiffres - Edition 2019. (2019).
2. IRSN. Radiothérapie - Les principes de la radiothérapie. <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/exposition-patients-sante-radioprotection/radiotherapie/radiotherapie-cancer> (2019).
3. Antoni, D. & Noël, G. Quelles contraintes pour quels organes à risque pour les radiothérapies chez l'adulte? *Cancer/Radiother.* **19**, 479–483 (2015).
4. Ortholan, C. *et al.* Guide des procédures de radiothérapie externe 2007. *Cancer/Radiother.* **11**, 329–330 (2007).
5. Kulik, C., Mazurier, J. & Lartigau, E. Probabilités de contrôle tumoral et de complications (TCP/NTCP) après radiothérapie : aspects méthodologiques , physiques et biologiques. *Cancer/Radiother.* **6**, (2002).
6. Barker, N. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 19–33 (2014).
7. Gerbe, F., Legraverend, C. & Jay, P. The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 2907–2917 (2012).
8. Gerbe, F. *et al.* Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* **529**, 226–230 (2016).
9. Yi, J. *et al.* Dclk1 in tuft cells promotes inflammation-driven epithelial restitution and mitigates chronic colitis. *Cell Death Differ.* **26**, 1656–1669 (2019).
10. Middelhoff, M. *et al.* Dclk1-expressing tuft cells: Critical modulators of the intestinal niche? *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **313**, 285-299 (2017).
11. Grecis, R. K. & Worthington, J. J. Tuft Cells: A New Flavor in Innate Epithelial Immunity. *Trends Parasitol.* **32**, 583–585 (2016).
12. Riley, P. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 27–33 (1994).
13. Azzam, E. I., Jay-gerin, J. & Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **327**, 48–60 (2012).
14. Potten, C. S. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and γ irradiation. *Nature* **269**, 518–521 (1977).
15. Moussa, L. *et al.* Bowel radiation injury: Complexity of the pathophysiology and promises of cell and tissue engineering. *Cell Transplant.* **25**, 1723–1746 (2016).
16. Rannou, E. *et al.* In vivo evidence for an mechanism in radiation-induced normal tissue injury. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
17. François, A., Milliat, F., Guipaud, O. & Benderitter, M. Inflammation and Immunity in Radiation Damage to the Gut Mucosa. *Biomed. Res. Int.*, (2013).
18. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **3**, 6–13 (2014).

19. Bessout, R. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation. *Mucosal Immunol.* **7**, 656–669 (2014).
20. Boschetti, G. & *et al.* Réponses immunitaires au cours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17. *Hépatogastro Oncol. Dig.* **19**, 446–454 (2012).
21. Grémy, O. *et al.* Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal γ -irradiation. *World J. Gastroenterol.* **14**, 7075–7085 (2008).
22. Bessout, R. *et al.* TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. *J. Pathol.* **237**, 435–446 (2015).
23. Blirando, K. *et al.* Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am. J. Pathol.* **178**, 640–651 (2011).
24. Durand, C., Pezet, S., Eutamène, H. & Sémont, A. Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment. *Pain* **156**, 1465–1476 (2015).
25. Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C. & Rossi, A. G. Neutrophil apoptosis: Relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* **2**, 216–227 (2010).
26. Ciz, M. *et al.* Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, (2012).
27. Wynn, T.A., Vannella, K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis Thomas. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
28. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
29. Saha, S. *et al.* Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat. Commun.* **7**, 1–16 (2016).
30. Latz, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 28–33 (2010).
31. Zaki, M. H. *et al.* The NLRP3 Inflammasome Protects against Loss of Epithelial Integrity and Mortality during Experimental Colitis. *Immunity* **32**, 379–391 (2010).
32. Rathinam, V. A. K. & Chan, F. K. M. Inflammasome, Inflammation, and Tissue Homeostasis. *Trends Mol. Med.* **24**, 304–318 (2018).
33. Dupaul-Chicoine, J. *et al.* Control of Intestinal Homeostasis, Colitis, and Colitis-Associated Colorectal Cancer by the Inflammatory Caspases. *Immunity* **32**, 367–378 (2010).
34. Siegmund, B. Previews Interleukin-18 in Intestinal Inflammation : Friend and Foe ? *Immunity* **32**, 300–302 (2010).

35. von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* **529**, 221–225 (2014).
36. Allen, J.E., Sutherland, T. E. Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Semin Immunol.* **26**, 329–340 (2014).
37. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
38. Feng, J. *et al.* IL-25 stimulates M2 macrophage polarization and thereby promotes mitochondrial respiratory capacity and lipolysis in adipose tissues against obesity. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 493–505 (2018).
39. Tomita, T. *et al.* Systemic, but Not Intestinal, IL-7 Is Essential for the Persistence of Chronic Colitis. (2019) doi:10.4049/jimmunol.180.1.383.
40. Zhang, W., Du, J. & Yu, Q. Interleukin-7 Produced by Intestinal Epithelial Cells in Response to *Citrobacter rodentium* Infection Plays a Major Role in Innate. **83**, 3213–3223 (2015).
41. Brockmann, L., Giannou, A. D., Gagliani, N. & Huber, S. Regulation of TH17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing, Tissue Regeneration, and Carcinogenesis. *Int. J Mol. Sci.* **18**, (2017).
42. Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X. & Reinecker, H. C. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**, 1001–1011 (2000).
43. Song, X. *et al.* Growth Factor FGF2 Cooperates with Interleukin-17 to Repair Intestinal Epithelial Damage Article Growth Factor FGF2 Cooperates with Interleukin-17 to Repair Intestinal Epithelial Damage. *Immunity* **43**, 488–501 (2015).
44. US Department of Health and Human Services. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). **Version 5.0**, (2017).
45. Andreyev, H., N, J., Wotherspoon, A., Denham, J. W. & Hauer-Jensen, M. Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era. *Lancet Oncol.* **11**, 310–312 (2010).
46. Andreyev, J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: Are they of any importance? *Gut* **54**, 1051–1054 (2005).
47. Andreyev, H. J. N. Gastrointestinal Problems after Pelvic Radiotherapy: the Past, the Present and the Future. *Clin. Oncol.* **19**, 790–799 (2007).
48. Camporesi, E. Side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med* **41**, 253–257 (2014).
49. Qadeer, M. A. & Vargo, J. J. Approaches to the prevention and management of radiation colitis. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **10**, 507–513 (2008).
50. Theis, V. S., Sripadam, R., Ramani, V. & Lal, S. Chronic Radiation Enteritis. *Clin. Oncol.* **22**, 70–83 (2010).
51. Andreyev, J. Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients. *Lancet. Oncol.* **8**, 1007–17 (2007).

52. Andreyev, H. J. N. *et al.* Guidance: The practical management of the gastrointestinal symptoms of pelvic radiation disease. *Frontline Gastroenterol.* **6**, 53–72 (2015).
53. Ferreira, M. R., Muls, A., Dearnaley, D. P. & Andreyev, H. J. N. Microbiota and radiation-induced bowel toxicity: Lessons from inflammatory bowel disease for the radiation oncologist. *Lancet Oncol.* **15**, e139–e147 (2014).
54. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
55. Tremaroli, V. & Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242–249 (2012).
56. Doré, J. & Corthier, G. Le microbiote intestinal. *Gastroentérologie Clin. Biol.* **34**, 7–15 (2010).
57. Sokol, H. Intestin, l'organe qui révolutionne la médecine - Les bactéries ne sont pas seules dans le microbiote. *Dossier pour la Science* 36–37 (2017).
58. Samuel, B. S. & Gordon, J. I. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10011–10016 (2006).
59. Marteau, P. & Doré, J. *Le microbiote intestinal - Un organe à part entière.* (2017).
60. Song, W. B. *et al.* Soluble intercellular adhesion molecule-1, D-lactate and diamine oxidase in patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **15**, 3916–3919 (2009).
61. Blachier, F. *et al.* Luminal sulfide and large intestine mucosa: Friend or foe? *Amino Acids* **39**, 335–347 (2010).
62. Kim, E., Coelho, D. & Blachier, F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutr. Res.* **33**, 983–994 (2013).
63. Dabard, J. *et al.* Ruminococcin A, a New Lantibiotic Produced by a Ruminococcus gnavus Strain Isolated from Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4111–4118 (2001).
64. Buffie, C. G. *et al.* Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* **517**, 205–208 (2015).
65. Hamer, H. M. *et al.* Review article: The role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**, 104–119 (2008).
66. Macpherson, A. J. *et al.* A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* **288**, 2222–2226 (2000).
67. Ulluwishewa, D. *et al.* Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *J. Nutr.* **141**, 769–776 (2011).
68. Savage, D. C., Siegel, J. E., Snellen, J. E. & Whitt, D. D. Transit time of epithelial cells in the small intestines of germfree mice and ex-germfree mice associated with indigenous microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 996–1001 (1981).
69. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Mezhitov, R. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal

- Homeostasis. *Cell* **118**, 229–241 (2004).
70. Bouskra, D. *et al.* Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* **456**, 507–510 (2008).
 71. Kolopp-Sarda, M. N. Système immunitaire muqueux et microbiote intestinal : Histoire d'une symbiose. *Rev. Francoph. des Lab.* **2016**, 39–47 (2016).
 72. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 411–420 (2008).
 73. Hooper, L. V. & Macpherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 159–169 (2010).
 74. Spits, H. & Cupedo, T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 647–675 (2012).
 75. Clarke, T. *et al.* Recognition of Peptidoglycan from the Microbiota by Nod1 Enhances Systemic Innate Immunity. *Nat Med* **16**, 228–231 (2010).
 76. Le Poul, E. *et al.* Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 25481–25489 (2003).
 77. Hasegawa, M. *et al.* Protective Role of Commensals against *Clostridium difficile* Infection via an IL-1 β -Mediated Positive-Feedback Loop. *J. Immunol.* **189**, 3085–3091 (2012).
 78. Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A. & Kuffa, P. NLRC4-driven interleukin-1 β production discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat. Immunol.* **13**, 449–456 (2012).
 79. Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V. & Kelsall, B. L. Inflammation switches the differentiation program of Ly6chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* **209**, 139–155 (2012).
 80. Wang, G. *et al.* Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 3917–3937 (2019).
 81. Liu, L. *et al.* Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell. Immunol.* **277**, 66–73 (2012).
 82. Mazzoni, A., Young, H. A., Spitzer, J. H., Visintin, A. & Segal, D. M. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J. Clin. Invest.* **108**, 1865–1873 (2001).
 83. Goldberg, R., Prescott, N., Lord, G. M., MacDonald, T. T. & Powell, N. The unusual suspects—innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 271–283 (2015).
 84. Sonnenberg, G. F. & Artis, D. Innate lymphoid cell interactions with the microbiota : implications for intestinal health and disease. *Immunity* **37**, 601–610 (2012).
 85. Sonnenberg, G. F. & Artis, D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med* **21**, 698–708 (2015).

86. Goto, Y. *et al.* Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* **345**, (2014).
87. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A. & Hymowitz, S. G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 71–109 (2011).
88. Crellin, N. K. *et al.* Regulation of cytokine secretion in human CD127+ LTi-like innate lymphoid cells by toll-like receptor 2. *Immunity* **33**, 752–764 (2010).
89. Zelante, T. *et al.* Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**, 372–385 (2013).
90. Qiu, J. *et al.* The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **36**, 92–104 (2012).
91. Vonarbourg, C. *et al.* Progressive loss of ROR γ t expression confers distinct functional fates to natural killer cell receptor-expressing ROR γ t+ innate lymphocytes. *Immunity* **33**, 736–751 (2010).
92. Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagami, O. & Suzuki, K. Adaptive Immune Regulation in the Gut: T Cell–Dependent and T Cell–Independent IgA Synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 243–273 (2009).
93. Lindner, C. *et al.* Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. *J. Exp. Med.* **209**, 365–377 (2012).
94. Hapfelmeier, S. *et al.* Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* **328**, 1705–1709 (2010).
95. Suzuki, K. *et al.* The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **33**, 71–83 (2010).
96. Tezuka, H. *et al.* Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929–933 (2007).
97. Mora, J. R. *et al.* Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* **314**, 1157–1160 (2006).
98. Agace, W. W. & McCoy, K. D. Regionalized Development and Maintenance of the Intestinal Adaptive Immune Landscape. *Immunity* **46**, 532–548 (2017).
99. Gaboriau-Routhiau, V. *et al.* The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* **31**, 677–689 (2009).
100. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L. & Shima, T. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485–498 (2009).
101. Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V. & Cerf-Bensussan, N. Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: An unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system. *Semin. Immunol.* **25**, 342–351 (2013).
102. Chung, H. *et al.* Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-

- Specific Microbiota. *Cell* **149**, 1578–1593 (2012).
103. Shaw, M. H., Kamada, N., Kim, Y. G. & Núñez, G. Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state T H17 cells in the intestine. *J. Exp. Med.* **209**, 251–258 (2012).
 104. Geuking, M. B. *et al.* Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity* **34**, 794–806 (2011).
 105. Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T. & Imaoka, A. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
 106. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12204–12209 (2010).
 107. Round, J. L. *et al.* The Toll-like receptor pathway establishes commensal gut colonization. *Science* **332**, 974–977 (2011).
 108. Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N. & Michaud, M. The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**, (2013).
 109. Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446–450 (2013).
 110. Arpaia, N. *et al.* Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451–455 (2013).
 111. Singh, N. *et al.* Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* **40**, 128–139 (2014).
 112. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β -and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 1757–1764 (2007).
 113. Mucida, D. *et al.* Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science*. **317**, (2007).
 114. Denning, T. L., Wang, Y. C., Patel, S. R., Williams, I. R. & Pulendran, B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* **8**, 1086–1094 (2007).
 115. Kim, S. V. *et al.* GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science*. **340**, 1456–1459 (2013).
 116. Kinoshita, M. *et al.* Dietary Folic Acid Promotes Survival of Foxp3⁺ Regulatory T Cells in the Colon. *J. Immunol.* **189**, 2869–2878 (2012).
 117. Rossi, M., Amaretti, A. & Raimondi, S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* **3**, 118–134 (2011).
 118. Petersen, C. & Round, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.* **16**, 1024–1033 (2014).
 119. Mirsepasi-Lauridsen, H. C. *et al.* Disease-specific enteric microbiome dysbiosis in

- Inflammatory Bowel disease. *Front. Med.* **5**, 1–8 (2018).
120. Wang, L. *et al.* Gut Microbial Dysbiosis in the Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies. *J. Acad. Nutr. Diet.* (2019) doi:10.1016/j.jand.2019.05.015.
 121. Siljander, H., Honkanen, J. & Knip, M. Microbiome and type 1 diabetes. *EBioMedicine* **46**, 512–521 (2019).
 122. Isolauri, E. Microbiota and Obesity. *Nestle Nutr Inst Work. Ser* **88**, 95–105 (2017).
 123. Szablewski, L. Human Gut Microbiota in Health and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **62**, 549–560 (2018).
 124. Fattorusso, A., Di Genova, L., Dell'isola, G. B., Mencaroni, E. & Esposito, S. Autism spectrum disorders and the gut microbiota. *Nutrients* **11**, (2019).
 125. Pietrucci, D. *et al.* Dysbiosis of gut microbiota in a selected population of Parkinson's patients. *Park. Relat. Disord.* **65**, 124–130 (2019).
 126. Koliarakis, I. *et al.* Oral Bacteria and Intestinal Dysbiosis in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4146 (2019).
 127. Karpinski, T. The Microbiota and Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **48**, 447–464 (2019).
 128. Reis Ferreira, M. *et al.* Microbiota- and Radiotherapy-Induced Gastrointestinal Side-Effects (MARS) Study: A Large Pilot Study of the Microbiome in Acute and Late-Radiation Enteropathy. *Clin. Cancer Res.* **25**, 6487-6500 (2019).
 129. Wang, A. *et al.* Gut microbial dysbiosis may predict diarrhea and fatigue in patients undergoing pelvic cancer radiotherapy: A pilot study. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
 130. Manichanh, C. *et al.* The gut microbiota predispose to the pathophysiology of acute postradiotherapy diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 1754–1761 (2008).
 131. Wang, Z. *et al.* Gut microbial dysbiosis is associated with development and progression of radiation enteritis during pelvic radiotherapy. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 3747–3756 (2019).
 132. Nam, Y. Do, Kim, H. J., Seo, J. G., Kang, S. W. & Bae, J. W. Impact of pelvic radiotherapy on gut microbiota of gynecological cancer patients revealed by massive pyrosequencing. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
 133. Zwieler, J. *et al.* Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One* **6**, (2011).
 134. Salzman, N. H. & Bevins, C. L. Dysbiosis-A consequence of Paneth cell dysfunction. *Semin. Immunol.* **25**, 334–341 (2013).
 135. Danielsson, A. *et al.* Chronic diarrhoea after radiotherapy for gynaecological cancer: Occurrence and aetiology. *Gut* **32**, 1180–1187 (1991).
 136. Ciorba, M. A. & Stenson, W. F. Probiotic Therapy in Radiation-Induced Intestinal Injury and Repair. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1165**, 190–194 (2009).

137. Scartoni, D. *et al.* Nutritional supplement based on zinc, prebiotics, probiotics and vitamins to prevent radiation-related gastrointestinal disorders. *Anticancer Res.* **35**, 5687–5692 (2015).
138. Crawford, P. A. & Gordon, J. I. Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13254–9 (2005).
139. Gerassy-Vainberg, S. *et al.* Radiation induces proinflammatory dysbiosis: transmission of inflammatory susceptibility by host cytokine induction. *Gut* **67**, 97–107 (2018).
140. Carvalho, F. A. *et al.* Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1051–60 (2008).
141. Hoffmann, T. W. *et al.* Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice. *ISME J.* **10**, 460–477 (2016).
142. Eun, C. S. *et al.* Induction of bacterial antigen-specific colitis by a simplified human microbiota consortium in gnotobiotic interleukin-10^{-/-} mice. *Infect. Immun.* **82**, 2239–2246 (2014).
143. Mcheik, S., Al-Akl, N. & Abdelnoor, A. The Effect of Denatured Flagellin on Toll-Like Receptor-5 (TLR-5) in Mice. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **18**, 412–416 (2018).
144. Lacave-Lapalun, J.-V., Benderitter, M. & Linard, C. Flagellin and LPS each restores rat lymphocyte populations after colorectal irradiation. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 931–940 (2014).
145. Kurkjian, C. J. *et al.* The Toll-Like Receptor 2/6 Agonist, FSL-1 Lipopeptide, Therapeutically Mitigates Acute Radiation Syndrome. *Sci. Rep.* **7**, 17355 (2017).
146. Krieg, A. M. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709–760 (2002).
147. Burdelya, L. G. *et al.* An Agonist of Toll-Like Receptor 5 Has Radioprotective Activity in Mouse and Primate Models. *Science* **320**, 226–230 (2008).
148. Saha, S. *et al.* Tlr9 agonist protects mice from radiation-induced gastrointestinal syndrome. *PLoS One* **7**, (2012).
149. Wos-Oxley, M. L. *et al.* Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. *Gut Microbes* **3**, 1–16 (2012).
150. Flemer, B. *et al.* Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. *Gut Microbes* **8**, 428–439 (2017).
151. Winter, S. E. *et al.* Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science*. **339**, 708–711 (2013).
152. Winter, S. E. *et al.* Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**, 426–429 (2010).
153. Xiao, H. *et al.* Hydrogen-water ameliorates radiation-induced gastrointestinal toxicity

- via MyD88's effects on the gut microbiota. *Exp. Mol. Med.* **50**, e433 (2018).
154. Byndloss, M. X. *et al.* Microbiota-activated PPAR- γ -signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* **357**, 570–575 (2017).
 155. Quraishi, M. N. *et al.* Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **46**, 479–493 (2017).
 156. van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S. & EG, Z. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* **368**, 407–415 (2013).
 157. Debast, S. B. *et al.* European society of clinical microbiology and infectious diseases: Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 1–26 (2014).
 158. Sokol, H. Transplantation fécale. *Post'U* (2018).
 159. Harsch, I. A. & Konturek, P. C. Adhesion Ileus after Fecal Microbiota Transplantation in Long-Standing Radiation Colitis. *Case Rep. Gastrointest. Med.*, (2019).
 160. Cui, M. *et al.* Faecal microbiota transplantation protects against radiation-induced toxicity. *EMBO Mol. Med.* **9**, 448–461 (2017).
 161. Hill, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 506–514 (2014).
 162. García-Peris, P. *et al.* Effect of a mixture of inulin and fructo-oligosaccharide on *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* intestinal microbiota of patients receiving radiotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr. Hosp.* **27**, 1908–15 (2012).
 163. Pettersson, A., Johansson, B., Persson, C., Berglund, A. & Turesson, I. Effects of a dietary intervention on acute gastrointestinal side effects and other aspects of health-related quality of life: A randomized controlled trial in prostate cancer patients undergoing radiotherapy. *Radiother. Oncol.* **103**, 333–340 (2012).
 164. Salminen, E., Elomaa, I., Vapaatalo, H. & Salminen, S. Preservation of intestinal integrity during radiotherapy using live *Lactobacillus acidophilus* cultures. *Clin Radiol* **39**, 435–437 (1998).
 165. Urbancsek, H., Kazar, T., Mezes, I. & Neumann, K. Results of a double-blind, randomized study to evaluate the efficacy and safety of *Antibiophilus* in patients with radiation-induced diarrhoea. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**, 391–396 (2001).
 166. Delia, P. *et al.* Prevention of radiation-induced diarrhea with the use of VSL#3, a new high-potency probiotic preparation. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 2150–2152 (2002).
 167. Delia, P. *et al.* Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. *World J. Gastroenterol.* **13**, 912–915 (2007).
 168. Österlund, P. *et al.* *Lactobacillus* supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: A randomised study. *Br. J. Cancer* **97**, 1028–1034 (2007).

169. Giralt, J. *et al.* Effects of Probiotic Lactobacillus Casei DN-114 001 in Prevention of Radiation-Induced Diarrhea: Results From Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **71**, 1213–1219 (2008).
170. Chitapanarux, I. *et al.* Randomized controlled trial of live lactobacillus acidophilus plus bifidobacterium bifidum in prophylaxis of diarrhea during radiotherapy in cervical cancer patients. *Radiat. Oncol.* **5**, 1–6 (2010).
171. Timko, J. Probiotics as prevention of radiation-induced diarrhoea. *J. Radiother. Pract.* **9**, 201–208 (2010).
172. Demers, M., Dagnault, A. & Desjardins, J. A randomized double-blind controlled trial: Impact of probiotics on diarrhea in patients treated with pelvic radiation. *Clin. Nutr.* **33**, 761–767 (2014).
173. Linn, Y., Thu, K. & Win, N. Effect of Probiotics for the Prevention of Acute Radiation-Induced Diarrhoea Among Cervical Cancer Patients: a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Probiotics Antimicrob Proteins* **11**, 638–647 (2019).
174. Liu, Q. *et al.* Administration of Lactobacillus plantarum 299v reduces side-effects of external radiation on colon anastomotic healing in an experimental model. *Color. Dis.* **3**, 245–252 (2001).
175. Demirer, S. *et al.* Effects of probiotics on radiation-induced intestinal injury in rats. *Nutrition* **22**, 179–186 (2006).
176. Demirer, S. *et al.* Protective effects of Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus B3 on intestinal enzyme activities after abdominal irradiation in rats. *Nutr. Res.* **27**, 300–305 (2007).
177. Seal, M. G. *et al.* Experimental radiotherapy-induced enteritis: A probiotic interventional study. *J. Dig. Dis.* **8**, 143–147 (2007).
178. Ciorba, M. A. *et al.* Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. *Gut* **61**, 829–838 (2012).
179. Spyropoulos, B. G. *et al.* The effect of synbiotics on acute radiation-induced diarrhea and its association with mucosal inflammatory and adaptive responses in rats. *Dig. Dis. Sci.* **58**, 2487–2498 (2013).
180. Ki, Y. *et al.* The effect of probiotics for preventing radiation-induced morphological changes in intestinal mucosa of rats. *J. Korean Med. Sci.* **29**, 1372–1378 (2014).
181. Riehl, T. E. *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG protects the intestinal epithelium from radiation injury through release of lipoteichoic acid, macrophage activation and the migration of mesenchymal stem cells. *Gut* **68**, 1003–1013 (2019).
182. Lopez-Siles, M. *et al.* Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic Faecalibacterium prausnitzii can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 420–428 (2012).
183. Fitzgerald, C. B. *et al.* Comparative analysis of Faecalibacterium prausnitzii genomes shows a high level of genome plasticity and warrants separation into new species-level taxa. *BMC Genomics* **19**, 1–20 (2018).

184. Benevides, L. *et al.* New insights into the diversity of the genus *Faecalibacterium*. *Front. Microbiol.* **8**, 1–13 (2017).
185. Hold, G. L., Schwiertz, A., Aminov, R. I., Blaut, M. & Flint, H. J. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4320–4324 (2003).
186. Castillo, M. *et al.* Application of 16S rRNA gene-targeted fluorescence in situ hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**, 138–146 (2007).
187. Monteagudo-Mera, A. *et al.* High purity galacto-oligosaccharides (GOS) enhance specific *Bifidobacterium* species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. *Benef. Microbes* **7**, 247–264 (2016).
188. Oikonomou, G. *et al.* Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* Species with Health and Growth. *PLoS One* **8**, (2013).
189. Bjerrum, L. *et al.* Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult. Sci.* **85**, 1151–1164 (2006).
190. Meng, X. L. *et al.* Intestinal microbiota and lipid metabolism responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) following copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **160**, 257–264 (2018).
191. Foglesong, M. A., Cruden, D. L. & Markovetz, A. J. Pleomorphism of fusobacteria isolated from the cockroach hindgut. *J. Bacteriol.* **158**, 474–480 (1984).
192. Miquel, S. *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 255–261 (2013).
193. Plöger, S. *et al.* Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1258**, 52–59 (2012).
194. Quévrain, E. *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* **65**, 415–425 (2016).
195. Sokol, H. *et al.* Low counts of *faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 1183–1189 (2009).
196. Navab-Moghadam, F. *et al.* The association of type II diabetes with gut microbiota composition. *Microb. Pathog.* **110**, 630–636 (2017).
197. Lopez-Siles, M. *et al.* Changes in the Abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* Phylogroups I and II in the Intestinal Mucosa of Inflammatory Bowel Disease and Patients with Colorectal Cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 28–41 (2016).
198. Sokol, H. *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 16731–16736 (2008).

199. Zhang, M. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PLoS One* **9**, 6–15 (2014).
200. Zhou, L. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii produces butyrate to maintain Th17/Treg balance and to ameliorate colorectal colitis by inhibiting histone deacetylase 1. *J. Crohn's Colitis* **12**, S110–S111 (2018).
201. Qiu, X., Zhang, M., Yang, X., Hong, N. & Yu, C. Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J. Crohn's Colitis* **7**, e558–e568 (2013).
202. Martín, R. *et al.* The Commensal Bacterium Faecalibacterium prausnitzii Is Protective in DNBS-induced Chronic Moderate and Severe Colitis Models. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 417–430 (2014).
203. Huang, X. L. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii supernatant ameliorates dextran sulfate sodium induced colitis by regulating Th17 cell differentiation. *World J. Gastroenterol.* **22**, 5201–5210 (2016).
204. Carlsson, A. H. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **48**, 1136–1144 (2013).
205. Laval, L. *et al.* Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 and the commensal bacterium faecalibacterium prausnitzii A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut Microbes* **6**, 1–9 (2015).
206. Martín, R. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol.* **15**, 67 (2015).
207. Everts, B. *et al.* Migratory CD103 + dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. *J. Exp. Med.* **213**, 35–51 (2016).
208. Uhlig, H. H. *et al.* Differential Activity of IL-12 and IL-23 in Mucosal and Systemic Innate Immune Pathology. *Immunity* **25**, 309–318 (2006).
209. West, G., Matsuura, T., Levine, A., Klein, J. & Fiocchi, C. Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity. *Gastroenterology* **110**, 1683–1695 (1996).
210. Qiu, X., Zhang, M., Yang, X., Hong, N. & Yu, C. Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J. Crohn's Colitis* **7**, e558–e568 (2013).
211. Rossi, O. *et al.* Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci. Rep.* **6**, 18507 (2016).
212. Ratajczak, W. *et al.* Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochim. Pol.* **66**, 1–12 (2019).
213. Hamer, H. M. *et al.* Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin. Nutr.* **28**, 88–93 (2009).
214. Simeoli, R. *et al.* An orally administered butyrate-releasing derivative reduces neutrophil recruitment and inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine

- colitis. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 1484–1496 (2017).
215. Knudsen, K. E. B. *et al.* Impact of diet-modulated butyrate production on intestinal barrier function and inflammation. *Nutrients* **10**, (2018).
 216. Danilova, N., Abdulkhakov, S., Grigoryeva, T., Markelova, M. & Vasilyev, I. Markers of dysbiosis in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ter Arkh* **91**, 17–24 (2019).
 217. Shimotoyodome, A., Meguro, S., Hase, T., Tokimitsu, I. & Sakata, T. Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **125**, 525–531 (2000).
 218. Johansson, M. E. V. *et al.* Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* **5**, (2010).
 219. Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Holmén-Larsson, J. & Jabbar, K. S. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **63**, 281–291 (2014).
 220. Raouf, A. H. *et al.* Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: Reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis. *Clin. Sci.* **83**, 623–626 (1992).
 221. Tobisawa, Y., Imai, Y., Fukuda, M. & Kawashima, H. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. *J. Biol. Chem.* **285**, 6750–6760 (2010).
 222. Wrzosek, L. *et al.* Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* **11**, 61 (2013).
 223. Gaudier, E. *et al.* Butyrate regulation of glycosylation-related gene expression: Evidence for galectin-1 upregulation in human intestinal epithelial goblet cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1044–1051 (2004).
 224. Breyner, N. M. *et al.* Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from Faecalibacterium prausnitzii shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF- κ B pathway. *Front. Microbiol.* **8**, 1–8 (2017).
 225. Miquel, S. *et al.* Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of Faecalibacterium prausnitzii. *MBio* **6**, 1–10 (2015).
 226. Xing, J. *et al.* Ameliorative effects of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on experimental colitis and their mechanisms in rats. *Int. Immunopharmacol.* **15**, 524–531 (2013).
 227. Yan, Y., Wang, P., Sun, Y., Dong, Y. & Xing, J. Potential Mechanisms of 3, 4-Oxo-Isopropylidene-Shikimic Acid in Ameliorating 2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitis in Rats. *J. Interf. Cytokine Res.* **39**, 554–563 (2019).
 228. Cardenas, D., Le, T. & Cynober, L. L'alpha-cétoglutarate d'ornithine : mécanismes d'action et place actuelle en nutrition artificielle. *Nutrition* **16**, 151–163 (2002).

229. Dawson, D. J. *et al.* Changes in jejunal permeability and passive permeation of sugars in intestinal biopsies in coeliac disease and Crohn's disease. *Clin. Sci.* **74**, 427–431 (1988).
230. Lee, J. Anti-inflammatory effects of sinapic acid on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in mice. *Arch Pharm Res* **41**, 243–250 (2018).
231. Balaji, C., Muthukumar, J. & Nalini, N. Effect of sinapic acid on 1,2 dimethylhydrazine induced aberrant crypt foci, biotransforming bacterial enzymes and circulatory oxidative stress status in experimental rat colon carcinogenesis. *Bratsl Lek List.* **116**, 560–566 (2015).
232. Wells, J. M., Loonen, L. M. P. & Karczewski, J. M. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 41–48 (2010).
233. Maier, E., Anderson, R. C., Altermann, E. & Roy, N. C. Live *Faecalibacterium prausnitzii* induces greater TLR2 and TLR2/6 activation than the dead bacterium in an apical anaerobic co-culture system. *Cell. Microbiol.* **20**, 1–11 (2018).
234. Sander, L. E. *et al.* Sensing prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* **474**, 385–389 (2012).
235. Cario, E. Barrier-protective function of intestinal epithelial toll-like receptor 2. *Mucosal Immunol.* **1**, 62–66 (2008).
236. Le, B. & Yang, S. H. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* in prevention of inflammatory bowel disease. *Toxicol. Reports* **5**, 314–317 (2018).
237. Karczewski, J. *et al.* Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, 851–859 (2010).
238. Depaolo, R. W. *et al.* TLR6 drives differentiation of tolerogenic DC and contributes to LcrV-mediated plague pathogenesis. *Cell Host Microbe* **4**, 350–361 (2008).
239. Rios-Covian, D., Gueimonde, M., Duncan, S. H., Flint, H. J. & De Los Reyes-Gavilan, C. G. Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, (2015).
240. D'hoel, K. *et al.* Integrated culturing, modeling and transcriptomics uncovers complex interactions and emergent behavior in a three-species synthetic gut community. *Elife* **7**, 1–30 (2018).
241. Chassaing, B., Aitken, J. D. J., Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol* **104**, (2014).
242. Kiesler, P., Fuss, I. J. & Strober, W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Med. Hyg. (Geneve).* **59**, 241–248 (2001).
243. Pravda, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 2371–2384 (2005).
244. Dieleman, L. *et al.* Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* **107**, 1643–1652 (1994).

245. Dieleman, L. A. *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* **114**, 385–391 (1998).
246. Neurath, M., Fuss, I. & Strober, W. TNBS-colitis. *Int. Rev. Immunol.* **19**, 51–62 (2000).
247. Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stüber, E. & Strober, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* **182**, 1281–1290 (1995).
248. Strober, W. & Fuss, I. J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**, 1756-1767.e1 (2011).
249. Lawrance, I. C. *et al.* A Murine Model of Chronic Inflammation-Induced Intestinal Fibrosis Down-Regulated by Antisense NF- κ B. *Gastroenterology* **125**, 1750–1761 (2003).
250. Kumagai, T., Rahman, F. & Smith, A. M. The microbiome and radiation induced-bowel injury: Evidence for potential mechanistic role in disease pathogenesis. *Nutrients* **10**, (2018).
251. Rosa, O. Dela, Dalemans, W. & Lombardo, E. Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Front. Immunol.* **3**, 1–8 (2012).
252. Kim, H. S. *et al.* Implication of NOD1 and NOD2 for the differentiation of multipotent mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *PLoS One* **5**, 1–7 (2010).
253. Kol, A. *et al.* Gastrointestinal microbes interact with canine adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro and enhance immunomodulatory functions. *Stem Cells Dev.* **23**, 1831–1843 (2014).
254. Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L. & Betancourt, A. M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* **5**, (2010).
255. Chen, Y. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Directly Promote Inflammation by Canonical NLRP3 and Non-canonical Caspase-11 Inflammasomes. *EBioMedicine* **32**, 31–42 (2018).
256. Roediger, W. E. W. Intestinal mycoplasma in Crohn's disease. *Novartis Found. Symp.* **263**, 85–93 (2004).
257. Chen, W., Li, D., Paulus, B., Wilson, I. & Chadwick, V. S. High prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Dig. Dis. Sci.* **46**, 2529–2535 (2001).
258. Sémont, A. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Therapy Stimulates Endogenous Host Progenitor Cells to Improve Colonic Epithelial Regeneration. *PLoS One* **8**, (2013).
259. May, R., Qu, D., Weygant, N. & Chandrakesan, P. Dclk1 Deletion in Tuft Cells Results in Impaired Epithelial Repair After Radiation Injury. *Stem Cells* **32**, 822–827 (2014).
260. Rentea, R. M. *et al.* Radiation-induced changes in intestinal and tissue-nonspecific alkaline phosphatase: implications for recovery after radiation therapy. *Am. J. Surg.*

- 212, 602–608 (2016).
261. Flemer, B. *et al.* Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. *Gut Microbes* **8**, 428–439 (2017).
 262. Dörr, W. Radiobiology of tissue reactions. *Ann. ICRP* **44**, 58–68 (2013).
 263. Zhang, X. *et al.* Second-generation Probiotics Producing IL-22 Increase Survival of Mice After Total Body Irradiation. *In Vivo* **34**, 39–50 (2020).
 264. D’Incà, R. *et al.* Rectal administration of *Lactobacillus casei* DG modifies flora composition and toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 1178–1187 (2011).
 265. Gordon, M. & Farrell, M. Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement. Altern. Med.* **10**, (2010).
 266. Cha, Y. S., Seo, J. G., Chung, M. J., Cho, C. W. & Youn, H. J. A mixed formulation of lactic acid bacteria inhibits trinitrobenzene-sulfonic-acid-induced inflammatory changes of the colon tissue in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1438–1444 (2014).
 267. Terpend, K., Possemiers, S., Daguet, D. & Marzorati, M. Arabinogalactan and fructo-oligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 595–603 (2013).
 268. May, T., Mackie, R. I., Fahey, G. C., Cremin, J. C. & Garleb, K. A. Effect of fiber source on short-chain fatty acid production and on the growth and toxin production by *Clostridium difficile*. *Scand. J. Gastroenterol.* **29**, 916–922 (1994).
 269. Tomás-Navarro, M., Vallejo, F., Borrego, F. & Tomás-Barberán, F. A. Encapsulation and micronization effectively improve orange beverage flavanone bioavailability in humans. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 9458–9462 (2014).
 270. Miquel, S. *et al.* Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Gut Microbes* **5**, 146–151 (2014).
 271. Encarnação, J. C., Abrantes, A. M., Pires, A. S. & Botelho, M. F. Revisit dietary fiber on colorectal cancer: butyrate and its role on prevention and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* **34**, 465–478 (2015).
 272. Tirandaz, H. & Mohammadi, E. Efficient tumor targeting by anaerobic butyrate-producing bacteria. *Med. Hypotheses* **80**, 675–678 (2013).
 273. Ohkawara, S., Furuya, H., Nagashima, K., Asanuma, N. & Hino, T. Oral Administration of *Butyrivibrio fibrisolvens*, a Butyrate-Producing Bacterium, Decreases the Formation of Aberrant Crypt Foci in the Colon and Rectum of Mice. *J. Nutr.* **135**, 2878–2883 (2005).
 274. Chance, W., Cao, L., Kim, M., Nelson, J. & Fischer, J. Reduction of tumor growth following treatment with a glutamine antimetabolite. *Life Sci.* **42**, 87–94 (1987).
 275. Fahr, M. J., Kornbluth, J., Blossom, S., Schaeffer, R. & Kumberg, V. S. Glutamine Enhances Immunoregulation of Tumor Growth. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **18**, 471–476 (1994).

276. Erickson, R., Ross, D. & Medina, J. Effects of glutamine on head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol. Neck Surg.* **121**, 348–354 (1999).
277. Hörig, H. *et al.* Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *J. Cell. Biochem.* **53**, 343–351 (1993).
278. Klimberg, V. S. *et al.* Glutamine suppresses PGE2 synthesis and breast cancer growth. *J. Surg. Res.* **63**, 293–297 (1996).
279. Sayles, C. *et al.* Oral Glutamine in Preventing Treatment-Related Mucositis in Adult Patients with Cancer: A Systematic Review. *Nutr. Clin. Pract.* **31**, 171–179 (2016).
280. Jolfaie, N., Mirzaie, S., Ghiasvand, R., Askari, G. & Miraghajani, M. The effect of glutamine intake on complications of colorectal and colon cancer treatment: A systematic review. *J. Res. Med. Sci.* **20**, 910–918 (2015).
281. Dupaul-Chicoine, J. *et al.* The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity* **43**, 751–763 (2015).
282. Latz, E., Xiao, T. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 397–411 (2013).
283. Harper, E. & Talbot, C. J. Is it Time to Change Radiotherapy: The Dawning of Chronoradiotherapy? *Clin. Oncol.* **31**, 326–335 (2019).
284. Voigt, R. M. *et al.* Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PLoS One* **9**, (2014).
285. Cui, M. *et al.* Circadian rhythm shapes the gut microbiota affecting host radiosensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
286. Dirksen, S. R., Epstein, D. R. & Hoyt, M. A. Insomnia, depression, and distress among outpatients with prostate cancer. *Appl. Nurs. Res.* **22**, 154–158 (2009).
287. Bettegowda, C., Dang, L., Abrams, R., Huso, D. & Dillehay, L. Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15083–15088 (2003).
288. Harrison, L. B., Chadha, M., Hill, R., Hu, K. & Shasha, D. Impact of Tumor Hypoxia and Anemia on Radiation Therapy Outcomes. *Oncologist* **7**, 492–508 (2002).
289. Wachsberger, P., Burd, R. & Dicker, A. P. Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: Exploring mechanisms of interaction. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1957–1971 (2003).
290. Teicher, B. Physiologic mechanisms of therapeutic resistance. Blood flow and hypoxia. *Hematol Oncol Clin North Am* **9**, 475–506 (1995).
291. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: Evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5233–5239 (2008).
292. Uribe-Herranz, M. *et al.* Gut microbiota modulate dendritic cell antigen presentation and radiotherapy-induced antitumor immune response. *J. Clin. Invest.* **130**, 466–479

- (2019).
293. Van Seville, Y. *et al.* Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* **17**, (2015).
 294. Chen, J., Pezhouh, M., Lauwers, G. & Masia, R. Histopathologic Features of Colitis Due to Immunotherapy With Anti-PD-1 Antibodies. *Am. J. Surg. Pathol.* **41**, 643–654 (2017).
 295. Abd El-Atti, S., Wasicek, K., Mark, S. & Hegazi, R. Use of probiotics in the management of chemotherapy-induced diarrhea: A case study. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **33**, 569–570 (2009).
 296. Wang, T. *et al.* Probiotics lactobacillus reuteri abrogates immune checkpoint blockade-associated colitis by inhibiting group 3 innate lymphoid cells. *Front. Immunol.* **10**, 1–13 (2019).
 297. Li, H. & Jia, W. Cometabolism of microbes and host: Implications for drug metabolism and drug-induced toxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 574–581 (2013).
 298. Wilson, I. D. & Nicholson, J. K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* **179**, 204–222 (2017).
 299. Lehouritis, P. *et al.* Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
 300. Marchetti, A., Di Lorito, A. & Buttitta, F. Why anti-PD1/PDL1 therapy is so effective? Another piece in the puzzle. *J. Thorac. Dis.* **9**, 4863–4866 (2017).
 301. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).
 302. Di Cerbo, A. & Palmieri, B. The market of probiotics. *Pak. J. Pharm. Sci.* **28**, 2199–2206 (2015).
 303. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.* (2005).
 304. Vahabnezhad, E., Mochon, A. B., Wozniak, L. J. & Ziring, D. A. Lactobacillus bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **47**, 437–439 (2013).
 305. Farina, C., Arosio, M., Mangia, M. & Moioli, F. Lactobacillus casei subsp. rhamnosus Sepsis in a Patient With Ulcerative Colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **33**, 251–252 (2001).
 306. Fang, H., Fu, L. & Wang, J. Protocol for Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res. Int.* **2018**, (2018).
 307. Affagard, H., May, S. & Verghese, J. *MaaT Pharma Presents Positive Phase 1b/2a Study Results in Acute Myeloid Leukemia Patients at the ASH 2018 Annual Meeting.* (2018).
 308. Papanicolas, L. E. *et al.* Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine* **41**, 509–516 (2019).
 309. Wu, G. D. *et al.* Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes.

Science **334**, 105–109 (2011).

310. Martinez-Medina, M. *et al.* Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation. *Gut* **63**, 116–124 (2014).
311. Shang, Y., Khafipour, E., Derakhshani, H. & Sarna, L. K. Short Term High Fat Diet Induces Obesity-Enhancing Changes in Mouse Gut Microbiota That are Partially Reversed by Cessation of the High Fat Diet. *Lipids* **52**, 499–511 (2017).
312. Huttenhower, C., Kostic, A. D. & Xavier, R. J. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity* **40**, 843–854 (2014).
313. Araújo, J. R., Tomas, J., Brenner, C. & Sansonetti, P. J. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie* **141**, 97–106 (2017).
314. Vangay, P., Johnson, A., Ward, T., Al-Ghalith, G. & Shields-Cutler, R. U.S. immigration westernizes the human gut microbiome. *Cell* **175**, 962–972 (2018).
315. Yu, C., Liu, S., Chen, L. & Shen, J. Effect of exercise and butyrate supplementation on microbiota composition and lipid metabolism. *J Endocrinol* **243**, 125–135 (2019).
316. Allen, J., Mailing, L., Niemira, G., Moore, R. & Cook, M. Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **50**, 747–757 (2018).
317. Bressa, C. *et al.* Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).
318. Becattini, S., Taur, Y. & Pamer, E. E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med* **22**, 458–478 (2016).
319. Isaac, S. *et al.* Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 128–136 (2017).
320. Lewis, B. B. *et al.* Loss of Microbiota-Mediated Colonization Resistance to *Clostridium difficile* Infection with Oral Vancomycin Compared with Metronidazole. *J. Infect. Dis.* **212**, 1656–1665 (2015).
321. Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. & Jansson, J. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* **1**, 56–66 (2007).
322. Buffie, C. G. *et al.* Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect. Immun.* **80**, 62–73 (2012).
323. Risnes, K. R., Belanger, K., Murk, W. & Bracken, M. B. Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. *Am. J. Epidemiol.* **173**, 310–318 (2011).
324. O’Sullivan, Ó. *et al.* Alterations in intestinal microbiota of elderly irish subjects post-antibiotic therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 214–221 (2013).
325. Drago, L., Valentina, C. & Fabio, P. Gut microbiota, dysbiosis and colon lavage. *Dig.*

- Liver Dis.* **51**, 1209–1213 (2019).
326. Goodrich, J. K. *et al.* Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* **19**, 731–743 (2016).
 327. Dicksved, J. *et al.* Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* **2**, 716–727 (2008).
 328. Hedin, C. R., van der Gast, C. J., Stagg, A. J., Lindsay, J. O. & Whelan, K. The gut microbiota of siblings offers insights into microbial pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* **8**, 1–7 (2017).
 329. Rahmouni, O., Dubuquoy, L., Desreumaux, P. & Neut, C. Microbiote intestinale et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Medecine/Sciences* **32**, 968–973 (2016).
 330. Lopez-Serrano, P., Perez-Calle, J. & Perez-Fernandez, M. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand. J. Gastroenterol.* **45**, 1464–1471 (2010).
 331. Bernstein, C., Rawsthorne, P., Cheang, M. & Blanchard, J. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am. J. Gastroenterol.* **101**, 993–1002 (2006).
 332. Castiglione, F. *et al.* Risk factors for inflammatory bowel diseases according to the 'hygiene hypothesis': A case-control, multi-centre, prospective study in Southern Italy. *J. Crohn's Colitis* **6**, 324–329 (2012).
 333. Charbord, P. & Casteilla, L. La biologie des cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine. *Medecine/Sciences* **27**, 261–267 (2011).
 334. Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, P. & De Ugarte, D. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
 335. Grégoire, C. *et al.* Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **45**, 205–221 (2017).
 336. Peiffert, D., Simon, J. M. & Eschwege, F. L'accident d'Épinal : passé, présent, avenir. *Cancer/Radiotherapie* **11**, 309–312 (2007).
 337. Voswinkel, J. *et al.* Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: A comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **45**, 180–192 (2013).
 338. Saha, S. *et al.* Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One* **6**, (2011).
 339. Sémont, A. *et al.* Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ.* **17**, 952–961 (2010).
 340. Gong, W. *et al.* Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury. *Cell Death Dis.* **7**, e2387-8 (2016).
 341. Chang, P. *et al.* Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal

- stem cells on radiation-induced intestinal injury. *Cell Death Dis.* **4**, 1–13 (2013).
342. Han, Y. M. *et al.* The efficacy of human placenta-derived mesenchymal stem cells on radiation enteropathy along with proteomic biomarkers predicting a favorable response. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 1–15 (2017).
343. Linard, C. *et al.* Repeated Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Injections Improve Radiation-Induced Proctitis in Pigs. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 916–927 (2013).
344. Brittan, M. *et al.* Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* **50**, 752–757 (2002).
345. Stenson, W. F. Prostaglandins and the epithelial response to radiation injury in the intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**, 61–64 (2004).
346. Goessling W. *et al.* Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration Wolfram. *Cell* **136**, 1136–1147 (2009).
347. Gao, Z. *et al.* Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice. *Cytotherapy* **14**, 267–273 (2012).
348. Jeffery, V., Goldson, A. J., Dainty, J. R. & Chieppa, M. Interleukin-6 signaling regulates small intestinal crypt homeostasis. *J. Immunol.* **199**, 304–311 (2017).
349. Kuhn, K. A., Manieri, N. A., Liu, T. C. & Stappenbeck, T. S. IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS One* **9**, 1–18 (2014).
350. Kim, K. Y. *et al.* Acer palmatum thumb. Ethanol extract alleviates Interleukin-6-induced barrier dysfunction and dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation. *J. Immunol. Res.* **2018**, (2018).
351. Xiao, Y. T., Yan, W. H., Cao, Y., Yan, J. K. & Cai, W. Neutralization of IL-6 and TNF- α ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis. *Cytokine* **83**, 189–192 (2016).
352. Sreeramkumar, V., Fresno, M. & Cuesta, N. Prostaglandin E2 and T cells: Friends or foes. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 579–586 (2012).
353. Rodriguez, M., Domingo, E. & Municio, C. Polarization of the Innate Immune Response by Prostaglandin E2: A Puzzle of Receptors and Signals. *Mol. Pharmacol.* **85**, 187–197 (2014).
354. Shook, B., Xiao, E., Kumamoto, Y., Iwasaki, A. & Horsley, V. CD301b+ Macrophages Are Essential for Effective Skin Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1885–1891 (2016).
355. Soulas, C. *et al.* Recently infiltrating MAC387+ monocytes/ macrophages: A third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *Am. J. Pathol.* **178**, 2121–2135 (2011).