

Université de Sherbrooke

**La signalisation des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ régule la niche des cellules
souches intestinales**

Par
Raphaëlle Servant
Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maitre ès sciences (M. Sc.)
en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Septembre 2018

Membres du jury d'évaluation
Pre Nathalie Perreault, Programme de Biologie Cellulaire
Pre Marie-Josée Boucher, Programme de Biologie Cellulaire
Pre Nathalie Fauchoux, Département de génie chimique et de génie biotechnologique,
Faculté de Génie, Université de Sherbrooke

© Raphaëlle Servant, 2018

A mes parents et à ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours

RÉSUMÉ

La signalisation des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ régule la niche des cellules souches intestinales

Par

Raphaëlle Servant

Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Dans les cellules épithéliales intestinales, la voie de signalisation des BMPs est impliquée dans le maintien des cellules souches intestinales (CSI) et leur différenciation. Récemment, les cellules mésenchymateuses FOXL1⁺ ont été identifiées comme participant à la formation de la niche des CSI. Cette niche est composée de facteurs solubles et insolubles mésenchymateux et épithéliaux préservant la fonction des CSI. La perte de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ favorise la formation d'un microenvironnement toxique induisant la polypose dans le colon des souris âgées de 1 an. Le but de ce mémoire est d'évaluer comment la signalisation des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ module la niche des cellules souches intestinales. Dans un premier temps, nous proposons d'étudier le rôle de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ sur l'homéostasie des CSI et de leurs cellules filles. Dans un second temps, nous analyserons l'impact du microenvironnement sur la polypose intestinale en utilisant un modèle murin combinant une mutation ubiquitaire du suppresseur de tumeurs *Apc* et une délétion de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺. La perte du récepteur des BMPs *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺ entraîne une modification architecturale des iléons des souris de 9 mois. Une diminution d'expression de *Noggin* dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} corrèle avec une différenciation précoce des cellules absorbantes. De plus, la voie Wnt-β-caténine est fortement activée dans les cryptes intestinales, se traduisant par une augmentation de la prolifération cellulaire. L'expression de marqueurs de CSI comme LGR5 et SOX9 est diminuée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Ces résultats montrent l'importance de la voie de signalisation des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ pour le maintien des CSI. La synergie entre la mutation d'*Apc* et la délétion de la voie des BMPs entraîne une augmentation de 3.8 fois du nombre de polypes dans le système digestif des souris âgées de 3 mois. Au niveau du colon, le nombre et la taille des polypes sont augmentés, et leur localisation est modifiée en faveur du colon distal. Le microenvironnement toxique présent chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} potentialise donc l'effet oncogénique de la mutation d'*Apc*. En conclusion, la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ régule la production de facteurs de la niche des CSI et maintient leur homéostasie. Elle est aussi impliquée dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des entérocytes. De plus, la perte de la voie de signalisation des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ potentialise l'effet oncogénique de la mutation d'*Apc*.

Mots clés: BMP, mésenchyme, niche, cellules souches, APC, cancer colorectal

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	i
Table des matières.....	ii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
1. Introduction.....	1
1.1 Le système gastro-intestinal et sa fonction.....	1
1.2 Le mésenchyme gastro-intestinal.....	6
1.2.1 Les cellules fibroblastiques et myofibroblastiques.....	6
1.2.2 La matrice extracellulaire.....	7
1.2.3 Les cellules immunitaires.....	7
1.3 Les cellules souches intestinales et leur niche.....	8
1.3.1 Les cellules souches intestinales actives et quiescentes.....	8
1.3.2 Le dynamisme des marqueurs des cellules souches.....	11
1.3.3 La niche des cellules souches.....	12
1.3.3.1 La niche épithéliale.....	13
1.3.3.2 La niche mésenchymateuse.....	14
1.3.4 Les cellules de la niche mésenchymateuse.....	16
1.4 Les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie intestinale.....	19
1.4.1 La voie de signalisation des BMPs.....	19
1.4.2 La voie de signalisation Wnt canonique.....	22
1.4.3 La voie de signalisation Notch.....	26
1.4.4 Interactions entre les voies BMP, Wnt et Notch.....	28
1.5 Le cancer colorectal.....	29
1.5.1 Description de la pathologie.....	29
1.5.2 Modélisation chez les souris.....	31
1.6 Hypothèse et objectifs de recherche.....	32
2. Matériel et méthodes.....	34

2.1 Souris modifiées génétiquement	34
2.2 Identification des souris et génotypage.....	35
2.3 Euthanasie des souris.....	36
2.4 Fixation des tissus	36
2.5 Microscopie électronique	36
2.6 Coloration Hématoxyline et Éosine (H&E)	37
2.7 Coloration des mucines acides par Alcian Bleu	38
2.8 Coloration des granules des cellules de Paneth par Best's Carmine.....	39
2.9 Coloration du collagène au Trichrome de Masson	39
2.10 Immunofluorescence sur tissus inclus en paraffine.....	40
2.11 Immunohistochimie selon le kit de Dako.....	41
2.12 Lyse des tissus pour extraire l'ARN et les protéines	43
2.13 Extraction d'ARN au phénol/chloroforme	43
2.14 Matrisperse	44
2.15 Extraction d'ARN avec la trousse Bio Basic.....	44
2.16 DNase sur les ARN extraits et Transcription Inverse	44
2.17 PCR quantitatif	45
2.18 Dosage des protéines extraites de tissus.....	47
2.19 Immunobuvardage de type Western des protéines extraites de tissus	47
2.20 Analyses statistiques	49
2.21 Irradiation des souris	50
2.22 Séquençage d'ARN et analyses statistiques	50
3. Résultats	52
3.1 La délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1 ⁺ entraîne une modification architecturale de l'iléon.....	52
3.2 Les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} présentent une modification de l'homéostasie cryptale .	53
3.3 La voie des BMPs dans les cellules FOXL1 ⁺ entraîne l'expression de facteurs de la niche mésenchymateuse des cellules souches intestinales.....	54
3.4 La voie des BMPs dans les cellules FOXL1 ⁺ régule la production des facteurs de la niche épithéliale.....	55
3.5 Les cellules souches sont affectées par la perte de la signalisation BMP dans les cellules FOXL1 ⁺	56

3.6 La délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1+ entraîne une suractivation de la voie Wnt-β-caténine	58
3.7 Impact de la délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1+ sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales	62
3.7.1 Les cellules entéroendocrines	63
3.7.2 Les cellules calciformes.....	64
3.7.3 Les cellules de Paneth	65
3.7.4 Les cellules absorbantes	68
3.8 Potentiel de régénération après irradiation	69
3.9 Implication de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1+ dans l'initiation du cancer colorectal	77
4. Discussion.....	86
5. Conclusion	96
6. Perspectives.....	98
7. Remerciements.....	102
8. Liste des références	103
9. Annexes	117

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Architecture de l'intestin	2
Figure 2. Schéma du processus de différenciation des cellules souches intestinales vers les différents types de cellules différenciées..	3
Figure 3. Schéma de la crypte intestinale distinguant les cellules souches actives et quiescentes.	10
Figure 4. Schéma représentant la plasticité des cellules souches quiescentes SOX9 ⁺	12
Figure 5. Schématisation de la niche des cellules souches intestinales.	15
Figure 6. Schéma distinguant les facteurs de la niche produits par les différents sous-types de cellules mésenchymateuses sub-épithéliales.	18
Figure 7. Schéma de la voie de signalisation des BMPs canonique.	20
Figure 8. Schéma de la voie non-canonique des BMPs.	21
Figure 9. Schématisation de la voie Wnt canonique.	24
Figure 10. Schématisation de la voie Notch.	27
Figure 11. La perte de <i>Bmpr1a</i> dans les cellules FOXL1 ⁺ entraîne une modification architecturale de l'iléon des souris dès 3 mois.	53
Figure 12. Augmentation de la fission cryptale dans les iléons des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	54
Figure 13. Analyse de l'expression des facteurs de la niche mésenchymateuse.	55
Figure 14. Perte d'expression de <i>Wnt3</i> suite à la délétion de la signalisation des BMPs dans les cellules FOXL1 ⁺	56
Figure 15. Caractérisation des cellules souches intestinales des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	57
Figure 16. Augmentation de la β-caténine nucléaire chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	59
Figure 17. Activation des cibles de la voie Wnt-β-caténine dans les intestins des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	60
Figure 18. Surexpression des cibles transcriptionnelles de MYC dans les iléons des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	61
Figure 19. Suractivation du cycle cellulaire et hyper-prolifération chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	62
Figure 20. Diminution de la voie Notch chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	63
Figure 21. Analyse des cellules entéroendocrines exprimant la chromogranine A	64
Figure 22. Augmentation du nombre de cellules caliciformes chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	65
Figure 23. La mutation de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1 ⁺ affecte les cellules de Paneth.....	66
Figure 24. Augmentation du nombre de grands granules dans les cellules de Paneth chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	67
Figure 25. Analyse des marqueurs des cellules de Paneth	68
Figure 26. Expression précoce de la SI dans les iléons des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	69
Figure 27. Analyse des mesures macroscopiques des souris irradiées	70
Figure 28. Comparaison de l'histologie des iléons des souris irradiées.	71

Figure 29. Augmentation des cellules prolifératives dans les iléons des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} irradiées.....	72
Figure 30. L'irradiation affecte la détermination des cellules caliciformes et Paneth.....	73
Figure 31. Accumulation de collagène 1 sub-épithélial dans le haut des villosités chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1}	75
Figure 32. Analyse des cellules apoptotiques dans les iléons des souris irradiées.....	76
Figure 33. Analyse de l'infiltration des lymphocytes dans l'épithélium des iléons des souris irradiées.....	77
Figure 34. Analyse du poids des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Apc</i> ^{Min/+} à 3 mois ainsi que du poids des rates.....	78
Figure 35. Augmentation du nombre de polypes dans le tube digestif chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Apc</i> ^{Min/+} à 3 mois.....	79
Figure 36. Analyse macroscopique des colons des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Apc</i> ^{Min/+} âgées de 3 mois.....	80
Figure 37. Aggravation histopathologique des polypes chez les souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Apc</i> ^{Min/+} à 3 mois.....	82
Figure 38. Histologie des colons des souris des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Apc</i> ^{Min/+} âgées de 3 mois.....	83
Figure 39. Analyse de la production de mucines dans les polypes des souris de 3 mois.....	84
Figure 40. Histologie des iléons des souris <i>Bmpr1a</i> ^{ΔFoxl1} ; <i>Apc</i> ^{Min/+} âgées de 3 mois.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des amorces utilisées pour le génotypage des souris	36
Tableau 2: Étapes de réhydratation des tissus	38
Tableau 3: Étapes de déshydratation des tissus	38
Tableau 4: Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence	41
Tableau 5: Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie	42
Tableau 6: Étapes de contre-coloration pour l'IHC	42
Tableau 7: Liste des amorces utilisées en RT-qPCR.....	46
Tableau 8: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunobuvardage.....	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM10: *ADAM Metallopeptidase Domain 10*
 ADN: acide désoxyribonucléique
 ADNc: ADN complémentaire
 APC: *adenomatous polyposis coli*
 ARN: acide ribonucléique
 ASCL2: *Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2*
 ATOH1: *Atonal BHLH Transcription Factor 1*
 BCA: bicinchoninic acid
 BMI: *BM1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger*
 BMP: *Bone morphogenetic protein*
 BMPR1A: *Bone morphogenetic protein receptor 1 A*
 BrdU: bromodésoxyuridine
 BSA: albumine de sérum bovin
 CBC: *Crypt base columnar*
 CC3: caspase 3 clivée
 CCK: cholécystokinine
 CCR: Cancer colorectal
 CD4: cluster de différenciation 4
 CDX2: *Caudal Type Homeobox 2*
 Cellules M: cellules Microfold
 CK1: *casein kinase 1*
 CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
 CMS: *Consensus Molecular Subtypes*
 DAB: 3,3'-diaminobenzidine
 DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole
 DCLK1: *Doublecortin Like Kinase 1*
 DEPC: pyrocarbonate d'éthyle
 DKK: *Dickkopf*
 DLL: *Delta like ligand*
 dNTP: désoxyribonucléotides
 EC: *Enterochromaffin*
 EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique
 EGF: *Epidermal Growth Factor*
 EphB1: Ephrine B1
 EphB2: Ephrine B2
 EtOH: Éthanol
 FACS: *Fluorescence activated cell sorting*
 FGF: *Fibroblast Growth Factor*
 GATA4: *GATA Binding Protein 4*
 GIP: *gastric inhibitory polypeptide*

GLP1/2: *glucagon like peptide*
GLUT2/5: *Glucose transporter*
GREML: *Gremlin*
GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*
GSK3: *glycogen synthase kinase 3*
H&E: *Hématoxyline et éosine*
HES1: *Hairy Enhancer of Split 1*
HGF: *Hepatocyte Growth Factor*
HMPS: *Hereditary mixed polyposis syndrome*
HOPX: *HOP Homeobox*
HRP: *horseradish peroxidase*
IHC: *Immunohistochimie*
IL-6: *Interleukine 6*
LEF1: *Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*
LGR: *Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor*
LOX: *lysyl-oxydase*
LRC: *label retaining cells*
LRIG1: *Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1*
LRP: *low density lipoprotein receptor-related protein*
MAM: *Mastermind*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*
MEC: *Matrice extracellulaire*
MeOH: *Méthanol*
MMP: *Matrix metalloprotéinase*
NICD: *Notch intracellular domain*
NOG: *Noggin*
OFUT1: *O-Fucosyltransferase 1*
OLFM4: *Olfactomedin 4*
Osc: *Oscillations*
PBS: *phosphate buffered saline*
PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*
PCR: *polymerase chain reaction*
PDGF: *Platelet-derived growth factor*
PFA: *Paraformaldehyde*
PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*
PVDF: *Polyvinylidene difluoride*
PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*
qPCR: *PCR quantitatif*
RBPJ: *Recombining binding protein suppressor of hairless*
RELM β : *Resistin Like Beta*
RIN: *RNA Integrity number*
RNF43: *Ring Finger Protein 43*
ROS: *Espèces réactives à l'oxygène*
RSPO: *R-spondine*
RT-qPCR : *Transcription inverse suivie d'un PCR quantitatif*
SEL-10: *Homologue de FBW7 (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7) chez C.Elegans*

SFRP: *secreted Frizzled-related proteins*

SI: *Sucrase-Isomaltase*

SMOC2: *SPARC Related Modular Calcium Binding 2*

SOX9: *SRY-Box 9*

TBP: *TATA-binding protein*

TCF: *Transcription Factor*

TEM: *Microscopie électronique à transmission*

TERT: *Telomerase Reverse Transcriptase*

TGF β : *Transforming growth factor β*

T_m : *température de fusion des amorces – Melting Temperature*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

WNT: *Wingless*

ZNRF3: *Zinc And Ring Finger 3*

β TRCP: *Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase*

1. INTRODUCTION

1.1 Le système gastro-intestinal et sa fonction

Le système gastro-intestinal humain est composé de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin, du colon et du rectum. Il comprend aussi le foie et le pancréas. L'intestin est divisé en 3 sections appelées le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Cette disposition permet à la nourriture ingérée d'être digérée de manière adéquate afin d'assimiler les nutriments nécessaires à la vie. Chez l'humain, la longueur de l'intestin grêle varie de 3 à 4 mètres. La présence de plis dans cette structure, de villosités ainsi que de microvillosités permet d'obtenir une surface d'absorption de 300 m². Au niveau de l'intestin, chaque section possède des caractéristiques histologiques et fonctionnelles propres. Le duodénum est responsable de l'absorption du fer, du calcium et de la vitamine D (Colston et al., 1994). La digestion se poursuit dans le jéjunum où les aliments sont digérés et assimilés. Les sels biliaires et les sécrétions pancréatiques se déversent dans le duodénum et permettent l'absorption des lipides dans le jéjunum sous forme de micelles. La caractéristique de l'iléon est son rôle dans l'absorption des sels biliaires et de la vitamine B12. Le côlon, quant à lui, est responsable de la réabsorption de l'eau et d'électrolytes (Na⁺) ainsi que de la formation des selles (Poitras, 2016).

Dans la lumière de l'intestin se situe le bol alimentaire et sont présents des virus, de nombreuses bactéries formant le microbiote et des agents produits par le système digestif comme les sels biliaires et le mucus. La présence d'une barrière efficace afin de protéger les cellules épithéliales contre ce contenu potentiellement toxique est cruciale pour le bon fonctionnement de l'organe. Cette barrière est assurée par une couche de mucus produite par les cellules caliciformes situées dans l'intestin grêle et le colon ainsi que par les jonctions serrées présentes entre les cellules épithéliales du tissu (Farquhar, 1963).

La structure histologique du tissu est composée de la muqueuse formée de l'épithélium, de la *lamina propria* et de la *muscularis mucosae*, puis de la sous-muqueuse, et des couches musculaires. Le schéma ci-dessous indique l'histologie intestinale (Figure 1 A). La structure

fonctionnelle de l'épithélium intestinal est composée de deux parties: la crypte de Lieberkühn et la villosité. La crypte forme une invagination dans la *lamina propria*. Dans la crypte se situent les cellules souches, les cellules de Paneth et les cellules progénitrices. En se divisant, les cellules souches vont donner naissance aux cellules progénitrices qui vont se différencier dans les différents types cellulaires retrouvés dans l'intestin tout en migrant vers le haut de la crypte (Barker, 2014). Une fois sorties de la crypte, les cellules différenciées et fonctionnelles arrivent dans la villosité puis au cours de leur vie elles vont continuer à migrer vers le haut de la villosité, mourir par apoptose/anoïkose une fois arrivées en haut et être libérées dans la lumière intestinale (Figure 1 B).

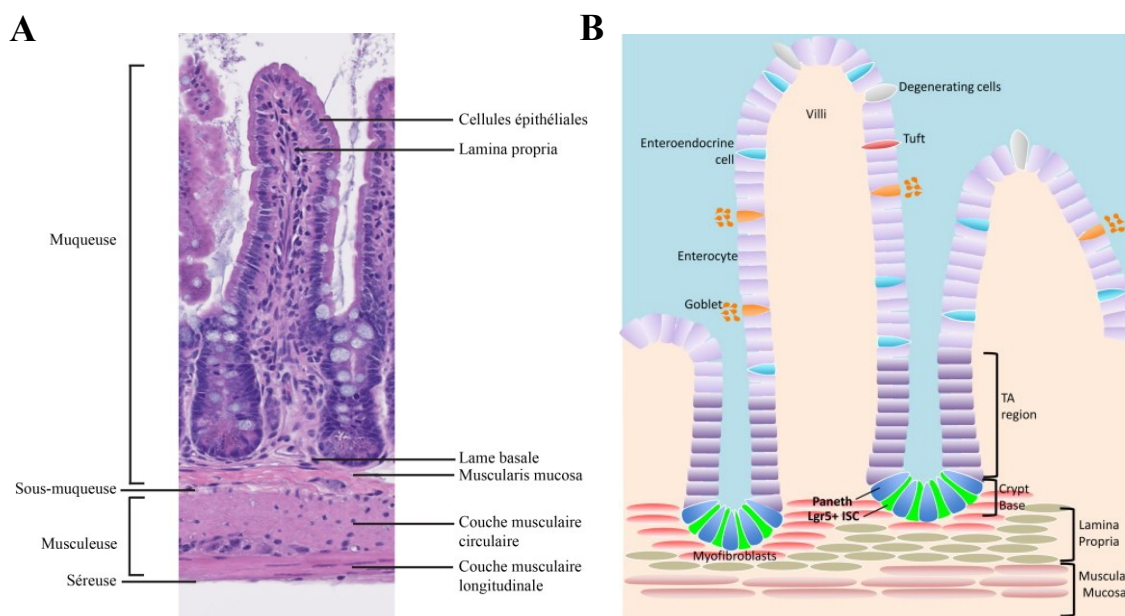


Figure 1. Architecture de l'intestin

A. Identification des différentes couches fonctionnelles composant l'intestin. B. Schéma illustrant les cellules composant l'épithélium intestinal. La base de la crypte est composée des cellules souches intestinales (*Intestinal Stem Cells; ISC*) et des cellules de Paneth. La crypte est ensuite constituée des cellules progénitrices prolifératives (*Transit Amplifying cells; TA*). Puis dans la villosité se situent les cellules différenciées comme les cellules caliciformes (*Goblet Cells*), les cellules absorbantes (*Enterocytes*), les cellules Tuft, les cellules entéroendocrines. Les cellules meurent à l'apex de la villosité par apoptose/anoïkose (*Degenerating cells*). Sous la crypte se situent des cellules mésenchymateuses comme par exemple les myofibroblastes, illustrés sur ce schéma. Image issue de la revue de Tan et Barker (Tan and Barker, 2015). Licence # 4381930601040.

Il existe deux lignées de cellules différenciées dans l'intestin: la lignée sécrétrice et la lignée absorbante (Noah et al., 2011). Les types cellulaires appartenant à la lignée sécrétrice sont les cellules de Paneth, caliciformes, entéroendocrines et Tuft. Les cellules de la lignée absorbante sont seules dans cette catégorie, elles portent donc le nom de la lignée. Le schéma de la Figure 2 indique la séquence d'événement permettant de former les différents types de cellules différenciées à partir des cellules souches actives. Ce schéma met l'emphase sur le rôle de la voie de Notch dans la différenciation cellulaire. La voie de Notch est décrite en détail dans la section 1.4.3.

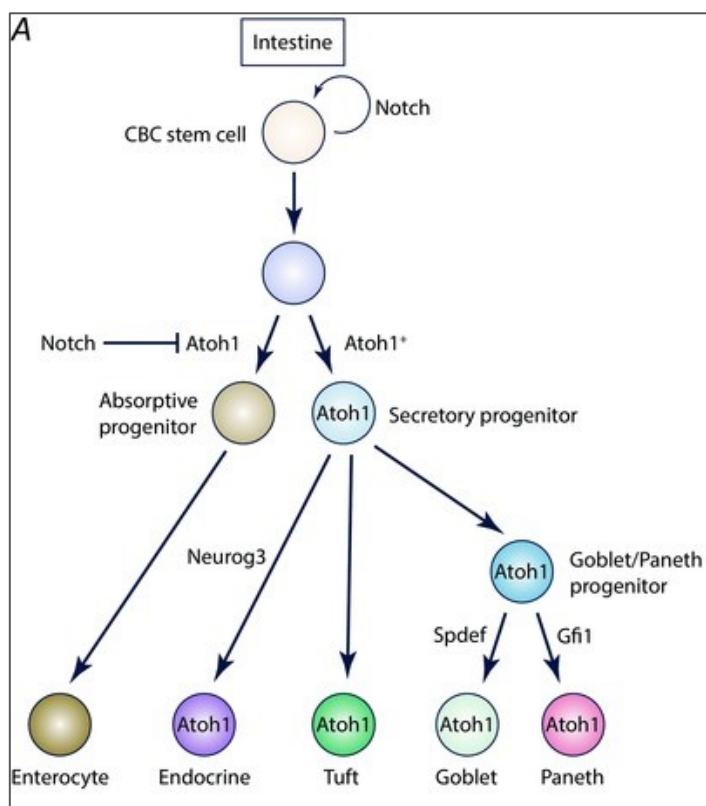


Figure 2. Schéma du processus de différenciation des cellules souches intestinales vers les différents types de cellules différenciées.

La cellule souche multipotente localisée au fond de la crypte va se diviser et former les cellules progénitrices. À l'aide de nombreux signaux moléculaires ces cellules vont se différencier et former les différents types de cellules épithéliales intestinales. Image tirée de la revue écrite par Demitrack et Samuelson en 2016 (Demitrack and Samuelson, 2016). Licence #4374841212787.

Les cellules absorbantes sont responsables de l'absorption des nutriments présents dans la lumière intestinale. Pour cela, elles expriment des enzymes de la famille des α -glucosidases, tels que la sucrase-isomaltase (SI), la thréalase ou encore la maltase-glucoamylase. La SI est la plus exprimée et est en mesure de cliver le plus grand nombre de substrat étant notamment responsable de la majorité du clivage des polysaccharides en monosaccharides (Gericke et al., 2016). Par exemple, la SI peut cliver le sucrose en glucose et fructose (Kishi et al., 1999). Les monosaccharides ainsi obtenus pourront être absorbés dans les cellules absorbantes via les récepteurs SGLT1 ou GLUT5 et ils seront mis dans la circulation sanguine grâce au transporteur GLUT2 (Drozdowski and Thomson, 2006).

Les cellules entéroendocrines, de par leur nombre dans l'immense tube digestif, constituent le plus grand organe endocrine du corps. Il en existe au moins 15 sous-types. Les peptides produits par les cellules entéroendocrines sont nombreux et régulent la sensation de faim et de satiété. Elles stimulent également la sécrétion d'enzymes pancréatiques et d'acide gastrique. Ces actions sont réalisées par la ghréline, la gastrine, la somatostatine, la CCK (*cholecystokinine*), la sécrétine, le GIP (*gastric inhibitory polypeptide*), GLP-1 et 2 (*glucagon like peptide*). Ces peptides peuvent agir de façon autocrine, paracrine, neurocrine mais principalement de façon endocrine, en tant qu'hormones (Posovszky et Wabitsch, 2015). La chromogranine A est produite dans les cellules entéroendocrines de type EC (*Enterochromaffin*) et L. Les cellules de type EC sont les plus présentes dans le tube gastro-intestinal (Gunawardene et al., 2011). La chromogranine A est donc un marqueur très fréquemment utilisé pour localiser les cellules entéroendocrines intestinales.

Les cellules caliciformes sont responsables de la production de mucus dans tout le tube digestif. Ce mucus a pour fonction de faciliter le passage du bol alimentaire mais aussi et surtout de protéger les cellules épithéliales du contenu luminal. Cette fonction est critique pour l'homéostasie intestinale sinon les bactéries du microbiome et les antigènes alimentaires seraient en mesure de toucher les cellules épithéliales et d'entraîner une cascade d'inflammation délétère pour l'organisme (Chandrakesan et al., 2012). Les cellules caliciformes produisent des glycoprotéines composant le mucus telles que les mucines MUC2 et MUC3. Plus récemment, il a été découvert que les cellules caliciformes étaient aussi en mesure de percevoir et de répondre à des signaux de danger comme l'infection, et

ainsi d'activer la réponse immunitaire. Par exemple, en cas d'infection, les cellules calciformes produisent la protéine Relm β . Relm β peut agir comme bactéricide contre les bactéries à Gram négatif et activer le recrutement des lymphocytes T et donc activer la réponse immunitaire (Morampudi et al., 2016; Propher et al., 2017). Elles seraient aussi en mesure de modifier la composition du microbiome (Allaire et al., 2017; Birchenough et al., 2015).

Les cellules de Paneth sont présentes à la base des cryptes intestinales et ont une durée de vie d'environ 3 à 8 semaines. Le premier rôle à leur avoir été attribué est la production de peptides antimicrobiens comme le lysozyme (Erlandsen et al., 1974) ou les défensines (Porter et al., 1997). Ces peptides sont sécrétés via des granules de sécrétion. Ces granules rendent les cellules de Paneth facilement identifiables par microscopie électronique à transmission (Bevins et Salzman, 2011). Les peptides antimicrobiens protègent l'organisme d'infection due à la charge bactérienne intestinale et contrôlent donc le microbiome intestinal (Salzman et al., 2010). Mise à part la production de peptides antimicrobiens, les cellules de Paneth ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des cellules souches (Sato et al., 2011). Cette caractéristique sera décrite en détail dans la section 1.3.3 de ce mémoire.

Les cellules Tuft sont présentes dans l'intestin mais aussi dans le système respiratoire. Elles ont une structure très spécialisée avec de grandes et larges microvillosités du côté de la lumière intestinale soutenues par des filaments serrés de cytosquelette. Ces cellules sont assez rares parmi les cellules épithéliales intestinales. Les cellules Tuft ont été associées avec l'induction de la réponse immunitaire de type 2 suite à la présence de parasites comme le Helminth. Cette réponse immunitaire est aussi associée avec les réactions allergiques, suggérant un rôle des cellules Tuft dans le développement des allergies alimentaires (Gerbe et al., 2012). Les cellules M (*Microfold*) sont des cellules différenciées impliquées dans la détection des antigènes présents dans la lumière intestinale. L'identification des étapes de leur différenciation ne permet pas encore de les classer dans une des catégories; absorbante ou sécrétrice (Knoop et al., 2009; Ohno, 2016).

1.2 Le mésenchyme gastro-intestinal

Le mésenchyme intestinal est formé de couches de cellules et de matrice extracellulaire (MEC) permettant la liaison de l'épithélium avec la couche musculaire. La MEC est présente partout dans le mésenchyme, entre les cellules. La lame basale est située directement sous l'épithélium et est une forme spécialisée de la MEC. En dessous de la lame basale se situent des fibres de collagène et les cellules mésenchymateuses sub-épithéliales. La structure et la composition de la lame basale varient le long de l'axe crypte-villosité (Beaulieu, 1992; Beaulieu et Vachon, 1994). En effet, la structure est serrée le long des cryptes et plus relâchée dans la villosité. Cela permet aux cellules immunitaires d'approcher les cellules épithéliales et de remplir leur fonction (Roulis et Flavell, 2016; Toyoda et al., 1997). Le mésenchyme intestinal est composé de fibroblastes, de myofibroblastes, de télocytes, de cellules du muscle lisse, de péricytes, de cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire telles que des lymphocytes, macrophages et neutrophiles (Pinchuk et al., 2010). Les cellules fibroblastiques ont des rôles différents selon leur position le long de l'axe crypte-villosité (Powell et al., 2011).

1.2.1 Les cellules fibroblastiques et myofibroblastiques

Les fibroblastes sont reconnaissables par leur expression de la vimentine. Ils possèdent un réticulum endoplasmique rugueux étendu, des granules de sécrétion du collagène et lient la MEC via des points d'adhésion focaux. Ces caractéristiques font de cette cellule un producteur important de la MEC et de facteurs solubles (Roulis et Flavell, 2016).

Les myofibroblastes sont des cellules contractiles puisqu'elles expriment l'actine du muscle lisse (α SMA). Ces cellules expriment aussi la vimentine et ont la capacité de produire du collagène I et IV ainsi que de la fibronectine, donc des éléments de la MEC (Adegboyega et al., 2002; Andoh et al., 2007). Les myofibroblastes produisent aussi des métalloprotéinases de la matrice (MMP, *Matrix Metalloproteinase*) dont MMP2 qui permet le remodelage de la matrice extracellulaire. La production des MMPs est activée en réponse à l'inflammation et permet le remodelage de la matrice activant la réparation de la blessure de l'épithélium. Ces caractéristiques montrent que les myofibroblastes participent activement au renouvellement matriciel et donc au remodelage du tissu en situation homéostatique et pathologique (Andoh

et al., 2007). Les myofibroblastes produisent aussi des cytokines et des chimiokines comme l'IL6 et le TGF β , ainsi que des facteurs de croissance tels que le HGF, EGF, FGF et VEGF par exemple (Pinchuk et al., 2010; Powell et al., 1999).

1.2.2 La matrice extracellulaire

Le rôle de la MEC est d'apporter un support aux tissus et aux organes, en plus d'instruire les cellules épithéliales. Les cellules d'un tissu forment des liaisons avec la MEC contrôlant la viabilité du tissu mais aussi l'activation de voies de signalisation dans les cellules, principalement via les intégrines. Les protéines de la MEC sont très grandes et complexes et forment des filaments ou fibrilles. Les protéines de la MEC sont entre autres des collagènes, des protéoglycanes, des glycoprotéines (fibronectine, laminine). Les éléments de la matrice lient beaucoup de facteurs de croissance sécrétés dans le mésenchyme par les cellules mésenchymateuses et épithéliales. Par exemple, la fibronectine lie des facteurs de croissance tels que VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et PDGF (*Platelet-derived growth factor*). D'autres molécules de la matrice comme le collagène lient des facteurs des voies Wnt, BMP et Hedgehog permettant de contrôler l'adressage de ces facteurs aux cellules épithéliales (Hynes et Naba, 2012). La formation de gradients au sein du tissu permet la formation de zones promouvant la prolifération et d'autres permettant la différenciation cellulaire (Hynes et Naba, 2012). Ces gradients de morphogènes sont aussi cruciaux lors du développement embryonnaire et du maintien de l'homéostasie chez l'adulte (Hynes, 2009).

1.2.3 Les cellules immunitaires

Les cellules stromales sont impliquées dans l'immunité innée et adaptative. Comme indiqué précédemment, les myofibroblastes peuvent produire des chimiokines et des cytokines. Cependant, en plus des cellules fibroblastiques, nombreuses cellules immunitaires sont présentes dans le stroma, permettant de répondre aux agressions faites à l'épithélium. La

lumière intestinale comprend de nombreuses bactéries du microbiome, et aussi des antigènes alimentaires. Il faut une balance finement régulée entre la tolérance et la réactivité immunitaire afin de ne répondre qu'aux réelles agressions. Les maladies inflammatoires intestinales sont issues d'un déséquilibre de cet équilibre. Les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes. Elles vont permettre l'activation des lymphocytes T CD4⁺, cellules cruciales pour l'immunité adaptative. Les cellules immunitaires sont en contact avec les autres cellules mésenchymateuses. Il a été montré que les myofibroblastes expriment les CMH de classe II (complexes majeurs d'histocompatibilité) permettant la présentation d'antigènes aux lymphocytes T (Saada et al., 2006). Cette capacité permet de limiter la présentation d'antigènes du contenu luminal afin d'éviter l'hyper-réactivité immunitaire (Pinchuk et al., 2010; Powell et al., 2011).

1.3 Les cellules souches intestinales et leur niche

Dans l'intestin murin, les cellules différenciées doivent être renouvelées tous les 3 jours environ. Ce renouvellement est permis grâce aux cellules souches multipotentes qui se divisent régulièrement afin de former les cellules progénitrices prolifératives qui se différencieront afin de générer les cellules absorbantes, caliciformes, entéroendocrines et de Paneth (Cheng et Leblond, 2005; Simons et Clevers, 2011). Deux types de cellules souches cohabitent dans l'intestin grêle: les cellules souches actives et les quiescentes. La caractérisation de ces deux types de cellules souches est en cours d'étude encore à ce jour (Clevers, 2013).

1.3.1 Les cellules souches intestinales actives et quiescentes

Identifié par Barker et collaborateurs en 2007, LGR5 (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*) est un marqueur des cellules souches actives dans l'intestin et le colon (Barker et al., 2007). Ces cellules sont positionnées entre les cellules de Paneth, au fond de la crypte intestinale. Ces cellules se divisent toutes les 24 heures. Grâce au système Cre-LacZ inducible, Barker et collaborateurs ont pu suivre le devenir des cellules LGR5⁺ dans le temps. Ils ont montré que les cellules LGR5⁺ renouvelaient l'entièreté des cellules

épithéliales et étaient en mesure de devenir des cellules caliciformes, de Paneth et absorbantes. Les cellules LGR5⁺ peuvent donc reformer tous les types de cellules épithéliales (Barker et al., 2007). D'autres marqueurs des cellules souches actives ont ensuite été identifiés tels que OLFM4 (Olfactomedin 4) (Van der Flier et al., 2009), ASCL2 (*Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2*) (Van der Flier et al., 2009), SMOC2 (*SPARC Related Modular Calcium Binding 2*) (Muñoz et al., 2012). Depuis quelques années, la capacité d'une cellule à former un entéroïde est devenue le test permettant de déterminer le potentiel souche d'une cellule. Une cellule triée par FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) par exemple pourra être mise en culture dans du Matrigel, avec un milieu de culture contenant de multiples facteurs de croissance. Le Matrigel est composé principalement de laminine, de collagène IV et d'entactine (Hughes et al., 2010). Le Matrigel remplace la MEC. Le milieu de culture ajouté comprend les facteurs régulant les cellules souches tels que des facteurs Wnts et des inhibiteurs des BMPs. Sato et collaborateurs ont réalisé cette technique pour la première fois en 2009 avec les cellules LGR5⁺ isolées (Sato et al., 2009). Après 14 jours de culture, une cellule individuelle LGR5⁺ aura formé un mini-intestin *in vitro* contenant des cellules souches, des cellules progénitrices, et des cellules différenciées. Cependant, l'utilisation des cellules LGR5⁺ isolées présente des limitations techniques qui seront expliquées à la section 1.3.3.1. Le mini-intestin possède tous les types de cellules différenciées (absorbantes, caliciformes, de Paneth, entéroendocrines). Sato et collaborateurs ont donc prouvé que les cellules LGR5⁺ étaient des cellules souches multipotentes. Cette méthode est devenue usuelle pour prouver qu'un marqueur identifie bien des cellules souches intestinales.

Puisque les cellules souches actives se divisent très régulièrement, elles sont prônes à mourir par apoptose, suite à des dommages par irradiation ou même en cas d'inflammation (Asfaha, 2015; Sureban et al., 2015). L'intestin est un organe crucial pour le maintien de la vie: sans absorption de nutriments, la mort est inévitable. C'est pourquoi des cellules souches de réserve, quiescentes et résistantes aux dommages liés aux irradiations et à l'inflammation forment le gilet de sauvetage de l'intestin.

Les cellules quiescentes ont été identifiées par leur capacité à conserver des agents intercalant de l'ADN (acide désoxyribonucléique) comme le BrdU (bromodésoxyuridine) ou la

thymidine- H^3 à long terme. Leur localisation est à la position +4 dans la crypte, c'est pourquoi elles peuvent aussi être nommées les « cellules souches +4 », c'est-à-dire la 4^{ème} cellule à partir du fond de la crypte. Cette position les localise juste au-dessus des cellules de Paneth. Dans les 10 dernières années, de nombreux marqueurs ont été proposés pour identifier des cellules souches quiescentes. Ces marqueurs sont TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*), BMI1 (*BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger*), HOPX (*HOP Homeobox*), LRIG1 (*Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1*), SOX9 (*SRY-Box 9*) et DCKL1 (*Doublecortin Like Kinase 1*) (Montgomery et al., 2011; Powell et al., 2012; Roche et al., 2015; Sangiorgi et Capecchi, 2008; Sato et al., 2009; Tian et al., 2011). Le nombre de marqueurs indique la présence probable d'une hiérarchie parmi les cellules souches +4, certaines étant sûrement des progéniteurs en voie de former des cellules sécrétrices, mais conservant la capacité de revenir vers un état souche (Richmond et al., 2016). La Figure 3 schématise les cellules épithéliales de la crypte, en distinguant les cellules souches actives et quiescentes (Barker, 2014).

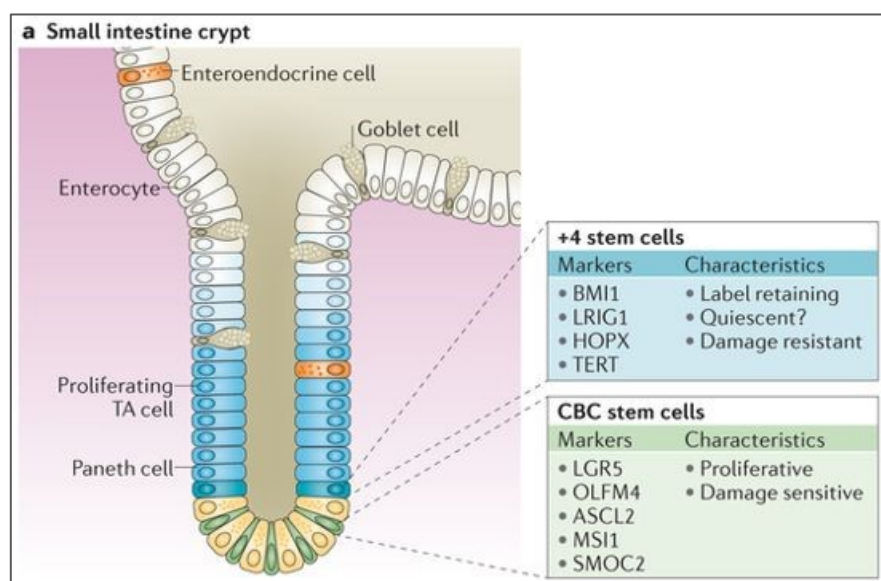


Figure 3. Schéma de la crypte intestinale distinguant les cellules souches actives et quiescentes.

Les marqueurs principaux des cellules souches actives (CBC sur le schéma) sont LGR5, OLFM4, ASCL2, MSI1 et SMOC2. Ces cellules sont prolifératives et sensibles aux dommages. Les cellules souches quiescentes (+4 sur le schéma) sont marquées par BMI1, LRIG1, HOPX et TERT. Elles ont une longue durée de vie, se divisent peu et sont résistantes aux dommages. Image issue de la revue écrite par N. Barker en 2014 (Barker, 2014). Licence # 4376081387480.

1.3.2 Le dynamisme des marqueurs des cellules souches

Cependant plusieurs études ont semé le doute quant à la distinction «blanc ou noir» de ces deux types de cellules souches intestinales. En effet, Munoz et collaborateurs ont séquencé le transcriptome des cellules LGR5⁺ et ont trouvé que ces cellules exprimaient aussi certains marqueurs pourtant assimilés aux cellules quiescentes comme BMI1, mTERT, HOPX et LRIG1 (Muñoz et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par Roche et collaborateurs (Roche et al., 2015). De plus, Roche et collaborateurs ont aussi montré que les cellules exprimant fortement SOX9 étaient des cellules souches, qui exprimaient aussi des marqueurs tels que la Chromogranine A, Chromogranine B et DCLK1. Ces protéines sont habituellement associées à des cellules différenciées de la lignée sécrétrice. Les souris invalidées pour SOX9 sont incapables de régénérer leur épithélium intestinal après irradiation, montrant que les cellules SOX9⁺ sont en effet des cellules souches radiorésistantes en mesure de régénérer le tissu en cas de fort dommage (Roche et al., 2015). Roche et collaborateurs en sont venus à proposer un nouveau modèle de plasticité entre les cellules souches actives et quiescentes (Figure 4). Ce modèle indique que, en situation d'homéostasie, les cellules souches actives se divisent et forment les cellules différenciées ainsi que des cellules souches quiescentes. La cellule souche quiescente serait en fait le progéniteur des cellules de la lignée sécrétrice, comme les cellules de Paneth. En situation de dommage, comme lors d'irradiation, les cellules souches quiescentes vont remplacer les cellules actives afin de maintenir l'homéostasie intestinale.

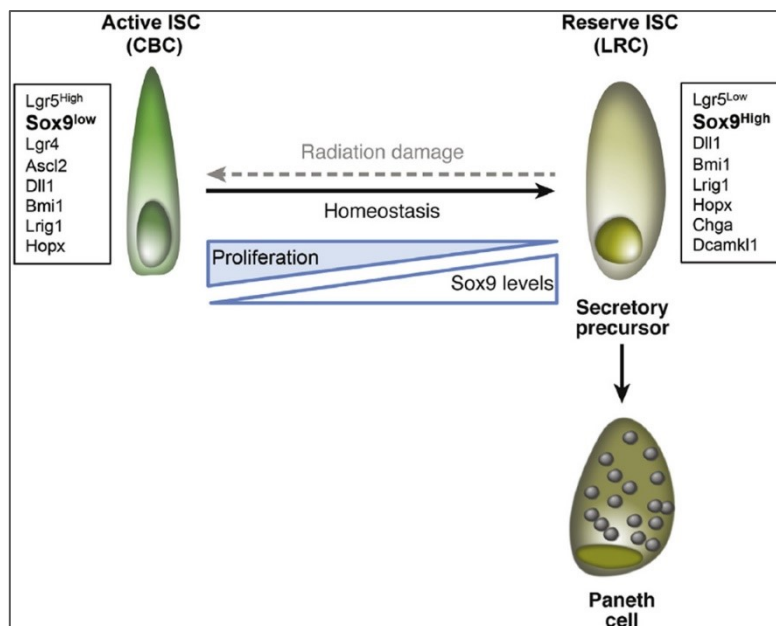


Figure 4. Schéma représentant la plasticité des cellules souches quiescentes SOX9⁺. Les cellules souches actives (*Active ISC, CBC*) peuvent former les cellules souches quiescentes (*Reserve ISC, LRC*) en situation d'homéostasie. Ces cellules souches quiescentes sont des progéniteurs de cellules sécrétrices dont les cellules de Paneth. Mais en cas de dommage, par exemple en cas d'irradiation, la cellule quiescente va s'activer et venir reformer les cellules actives afin de maintenir l'homéostasie intestinale. Image issue de Roche et al, 2015. Licence #4376071198624.

1.3.3 La niche des cellules souches

L'environnement entourant les cellules souches se nomme une niche. Elle est composée de facteurs chimiques et physiques sécrétés par les cellules épithéliales et mésenchymateuses adjacentes et forme un microenvironnement finement contrôlé permettant aux cellules souches de conserver leur statut de cellules souches, de proliférer et de se différencier (Yeung et al., 2011). Les facteurs chimiques sont des molécules comme des inhibiteurs de voie de signalisation, ou des facteurs de croissance alors que les facteurs physiques correspondent aux composantes de la MEC autour du fond de la crypte.

1.3.3.1 La niche épithéliale

En 2011 Sato et collaborateurs ont découvert que les cellules de Paneth constituaient la niche des cellules souches intestinales (Sato et al., 2011). Ils ont tout d'abord observé la localisation des cellules de Paneth par rapport aux cellules souches: ces cellules sont intercalées afin de minimiser le contact entre deux cellules de même type. Ils ont isolé par FACS les cellules souches LGR5⁺ et les cellules de Paneth, et les ont ensemencées dans du Matrigel en quantité égale. Ils ont observé un taux de 77% de réassociation des cellules, avec formation d'entéroïdes viables. Il semble donc que le contact entre une cellule souche et de Paneth favorise grandement la formation d'entéroïdes puisque l'ensemencement de cellules LGR5⁺ seules ne donne des entéroïdes que dans 7% des cas. Dans cette étude, ils ont aussi réalisé le profil transcriptionnel des cellules de Paneth. En plus des facteurs antimicrobiens attendus, ils ont observé l'expression de gènes codant pour des facteurs de la voie des Wnts (*Wnt3* et *Wnt11*), pour un ligand de la voie de Notch (*Dll4*) et pour des facteurs de croissance (*Egf* et *Tgfa*). Les voies de Wnt et Notch sont décrites plus en détail dans la section 1.4. Ils ont observé que l'ajout de 100ng/mL de WNT3 au milieu de culture des entéroïdes les rend sphériques après 6 jours en culture, signe d'absence de différenciation. En effet, les entéroïdes sont circulaires lorsque la prolifération est importante, puis ils forment des bourgeonnements lorsqu'ils commencent à se différencier. A ce moment l'entéroïde mime vraiment l'architecture intestinale puisqu'au fond des bourgeonnements se situent les cellules souches, les cellules en différenciation vont monter le long du bourgeonnement et arriver dans la partie des cellules différenciées puis le centre de l'entéroïde correspond à la lumière intestinale où les cellules mourant par apoptose ainsi que le mucus se déversent. La voie de Wnt- β -caténine est donc cruciale à la prolifération des cellules souches (Sato et al., 2011). Cependant plusieurs études ont montré que les cellules de Paneth sont dispensables pour les cellules souches. Durand et collaborateurs ont utilisé une souris ayant une délétion conditionnelle d'ATOH1 (*Atonal BHLH Transcription Factor 1*), supprimant toutes les cellules sécrétrices de l'intestin (Durand et al., 2012). Ils ont confirmé l'absence de cellules de Paneth, et de facteurs WNT comme WNT3, WNT6 et WNT9. Les cellules souches intestinales n'étaient pas affectées puisqu'elles continuaient de proliférer et la voie de Wnt- β -caténine y était active (Durand et al., 2012). Les mêmes résultats ont été obtenus en

invalidant WNT3 dans les cellules épithéliales intestinales (Farin et al., 2012). En effet les cellules souches continuaient à proliférer en absence de WNT3. Ces résultats suggèrent donc que les cellules de Paneth n'étaient pas les seules à pouvoir activer la voie de Wnt- β -caténine dans les cellules souches intestinales.

1.3.3.2 La niche mésenchymateuse

C'est naturellement vers les cellules mésenchymateuses que la recherche s'est tournée. Ces cellules péricryptales ont la localisation idéale pour agir sur les cellules souches puisqu'elles les jouxtent directement. De plus, dans les études avec les entéroïdes, Sato et collaborateurs ajoutent au milieu de culture des facteurs tels que la R-spondine (RSPO) et Noggin (NOG); facteurs sans lesquels les entéroïdes ne se développent pas (Sato et al., 2009). La RSPO et NOG sont des facteurs produits par le mésenchyme, donc l'étude de Sato démontre que les cellules souches LGR5⁺ peuvent former des entéroïdes sans cellules mésenchymateuses, mais des facteurs produits par celles-ci sont tout de même essentiels. Une cellule souche ne peut donc reformer un épithélium sans mésenchyme.

En 2012, Farin et collaborateurs ont montré que des cellules stromales soutenaient la croissance d'entéroïdes déficients en WNT3 (Farin et al., 2012). Ces résultats suggèrent donc que les cellules mésenchymateuses produisent des facteurs de la voie Wnt- β -caténine permettant le maintien des cellules souches (Farin et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont isolé les cryptes intestinales (cellules souches et cellules de Paneth) puis les ont mises en culture afin de former des entéroïdes. Ils n'ont pas utilisé de marqueurs mésenchymateux afin d'identifier les populations de cellules mésenchymateuses utilisées lors de la coculture. Ils ont même montré que l'ajout de WNT2B permettait de soutenir la croissance d'entéroïdes déficients en WNT3, précisant WNT2B comme candidat potentiel. Kabiri et collaborateurs ont indiqué l'importance de la RSPO1 pour la formation d'entéroïdes à partir de cryptes déficientes en WNTs (Kabiri et al., 2014). La RSPO3 a aussi été impliquée dans la niche des cellules souches intestinales. Une augmentation de RSPO3 entraîne une augmentation du nombre de cellules souches et de Paneth, conduisant éventuellement au développement d'hyperplasie et à la tumorigenèse (Hilkens et al., 2017). NOG est un inhibiteur de la voie

des BMPs et son expression est forte autour de la base de la crypte. NOG lie les BMPs et bloque ainsi leur liaison au récepteur, empêchant la transduction du signal. Ce facteur est ajouté au milieu de culture des entéroïdes car il permet aux cellules souches de maintenir un état prolifératif, avec une voie de Wnt- β -caténine active. Or la voie des BMPs inhibe la prolifération des cellules souches via l'inhibition de la voie Wnt- β -caténine (He et al., 2004). Donc la niche mésenchymateuse est composée de facteurs de la voie Wnt- β -caténine (WNT2B, WNT5A), de potentialisateurs de la voie Wnt- β -caténine (RSPO 1 et 3), et d'inhibiteurs de la voie des BMPs comme NOG et Gremlin (GREML).

La Figure 5 schématise la niche mésenchymateuse et épithéliale des cellules souches intestinales. Cette figure montre l'intensité des voies BMP et Wnt- β -caténine au fond de la crypte: la voie de Wnt- β -caténine est très active à la base de la crypte afin de permettre aux cellules souches de proliférer, alors que la voie des BMPs est plus active vers le haut de la crypte et dans la villosité afin de promouvoir la différenciation des cellules épithéliales. L'image indique la présence de fibroblastes péricryptaux (en orange) comme étant les producteurs des facteurs de la niche mésenchymateuse, mais des études datant des deux dernières années ont réfuté cette idée et ont permis de préciser l'identité des cellules de la niche mésenchymateuse (Aoki et al., 2016; Greicius et al., 2018; Stzpourginski et al., 2017).

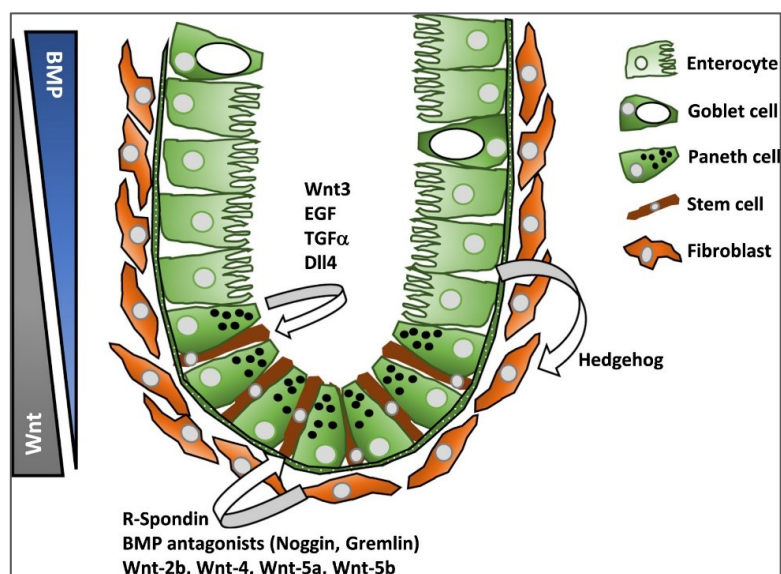


Figure 5. Schématisation de la niche des cellules souches intestinales. Les cellules de Paneth participent à la niche épithéliale, alors que les cellules

mésenchymateuses péricryptales participent à la niche mésenchymateuse. Sur cette image, les cellules mésenchymateuses sont identifiées comme étant des fibroblastes. La littérature a cependant avancé depuis et il a été montré que ce ne sont pas les fibroblastes mais plutôt des cellules exprimant FOXL1/CD34/Gp38/PDGFR α qui constituent la niche mésenchymateuse (Aoki et al., 2016; Greicius et al., 2018; Stzepourginski et al., 2017). Image issue de la revue de Roulis et Flavell, 2016. Licence #4375991468676.

1.3.4 Les cellules de la niche mésenchymateuse

L'identification des cellules responsables de la production des facteurs de la niche mésenchymateuse est encore en cours. En 2014, Kabiri et collaborateurs ont mis en culture des cellules stromales exprimant la vimentine et l' α SMA avec des cryptes de souris ayant une délétion de Porcupine (PORCN). Ces marqueurs mésenchymateux correspondent aux myofibroblastes. PORCN est responsable de modifications post-traductionnelles sur les facteurs WNT, sans lesquelles les facteurs ne peuvent pas être sécrétés. Dans ce modèle aucun facteur WNT n'est sécrété par l'épithélium. Ils ont observé que les cryptes ne pouvaient pas former des entéroïdes viables sans ajout de RSPO1 dans le milieu, à moins qu'elles soient placées en co-culture avec les myofibroblastes isolés. Ils ont montré que ces cellules mésenchymateuses exprimaient surtout WNT2B et WNT11 ainsi que la RSPO3 et la RSPO1. Cette étude montrait donc que les myofibroblastes étaient en mesure de produire la niche des cellules souches (Kabiri et al., 2014). En 2016, Aoki et collaborateurs, ont postulé que les cellules FOXL1⁺ étaient les cellules mésenchymateuses responsables de la niche. Premièrement ils ont localisé les cellules FOXL1⁺. Elles se situent en dessous de l'épithélium tout le long de l'axe crypte-villosité, et, de façon surprenante, n'expriment pas l' α SMA. Ces cellules ne sont donc pas des myofibroblastes. Ils ont mesuré l'expression des facteurs de la niche dans ces cellules et ont trouvé qu'elles exprimaient *Wnt2b*, *Wnt5a*, *Rspo3* et *Grem1* et 2. Ils ont observé qu'après 3 jours de délétion des cellules FOXL1⁺, la prolifération épithéliale cessait brutalement et il y avait une perte de la β -caténine active dans les cryptes en raison d'une absence de synthèse de facteurs WNT comme WNT2B et WNT5A. Une perte d'expression d'*Olfm4*, marqueur des cellules souches actives était aussi observée. Ils ont donc montré que les cellules non-myofibroblastiques FOXL1⁺ étaient en mesure de produire la niche mésenchymateuse et de soutenir les cellules souches (Aoki et

al., 2016). L'étude de Stzpourginski et collaborateurs en 2017 a confirmé les résultats obtenus par Aoki et collaborateurs, tout en découvrant un nouveau marqueur pour ces cellules. En effet, ils ont montré que les cellules CD34⁺/Gp38⁺ exprimaient FOXL1 et produisaient les facteurs de la niche. Tout d'abord, ils ont démontré que les cellules CD34⁺/Gp38⁺ étaient localisées autour de la crypte, juste en dessous de l'épithélium. Ils ont aussi montré que ces cellules n'exprimaient pas l' α SMA, donc qu'elles n'étaient pas des myofibroblastes. Ces cellules expriment *Wnt2b*, *Rspo1* et *Greml1* et elles sont en mesure de soutenir la prolifération des cellules souches lors d'une expérience de coculture avec des entéroïdes (Stzpourginski et al., 2017). Cependant, ces cellules n'expriment pas *Wnt5a*, alors que les cellules myofibroblastiques CD34⁻ l'expriment. Ils ont aussi montré que les cellules CD34⁻ étaient positives pour l' α SMA, et exprimaient des facteurs de la voie des BMPs comme *Bmp2* et *4*, favorisant la différenciation cellulaire. Il est donc important que les cellules CD34⁻ ne soient pas autour de la crypte, sinon les cellules souches recevraient des signaux de différenciation et arrêteraient de proliférer. Cela correspond à ce qui a été observé en enlevant les cellules FOXL1⁺.

En 2018, un autre marqueur de cellules mésenchymateuses de la niche a été mis en évidence par Greicius et collaborateurs (Greicius et al., 2018). Il s'agit du récepteur PDGFR α . Ils ont d'abord montré que la RSPO3 était produite par des cellules α SMA⁺ et PDGFR α ⁺, autour de la crypte. Cela contredit ce qui avait été dit par Aoki et collaborateurs en 2016, puisque ces derniers indiquaient que les cellules FOXL1⁺ α SMA⁻ produisaient la RSPO3. Une nouvelle étude du laboratoire ayant publié l'article d'Aoki a montré, en 2018, que les cellules FOXL1⁺ exprimaient en effet *Rspo3* mais moins de 6 fois par rapport aux myofibroblastes FOXL1⁻ (Shoshkes-Carmel et al., 2018). Greicius et collaborateurs ont aussi déterminé quels marqueurs mésenchymateux sont exprimés par les cellules PDGFR α ⁺. Ils ont observé l'expression de *Acta2*, *α SMA* et *Gli1* dans toutes les cellules PDGFR α ⁺ et *Foxl1*, *Greml2* et *Myh11* dans certaines cellules PDGFR α ⁺ (Greicius et al., 2018). Cette étude a montré que PDGFR α était un marqueur général pour les cellules mésenchymateuses produisant la niche des cellules souches intestinales. Ces cellules produisent des facteurs WNTs et la RSPO 1 et 3 ainsi que GREML2. Les autres études ont montré que les cellules non-myofibroblastiques FOXL1⁺ et CD34⁺/Gp38⁺ sont les cellules exprimant des WNTs et RSPO2, mais peu RSPO3. A la lumière de ces résultats contradictoires, il est difficile de déterminer un unique marqueur

des cellules mésenchymateuses de la niche. Néanmoins, le type cellulaire télocyte permet d'englober tous ces types cellulaires. Les télocytes sont des cellules de soutien de nombreux organes, caractérisés par de très longues protrusions. Premièrement, CD34 a été identifié comme marqueur des télocytes intestinaux (Pieri et al., 2008), puis PDGFR α en 2013 (Vannucchi et al., 2013) et enfin FOXL1 en 2018 (Shoshkes-Carmel et al., 2018). Il est donc possible de suggérer que ce sont les télocytes qui produisent les facteurs de la niche mésenchymateuse des cellules souches. Le schéma présenté à la Figure 6 permet de récapituler ce paragraphe.

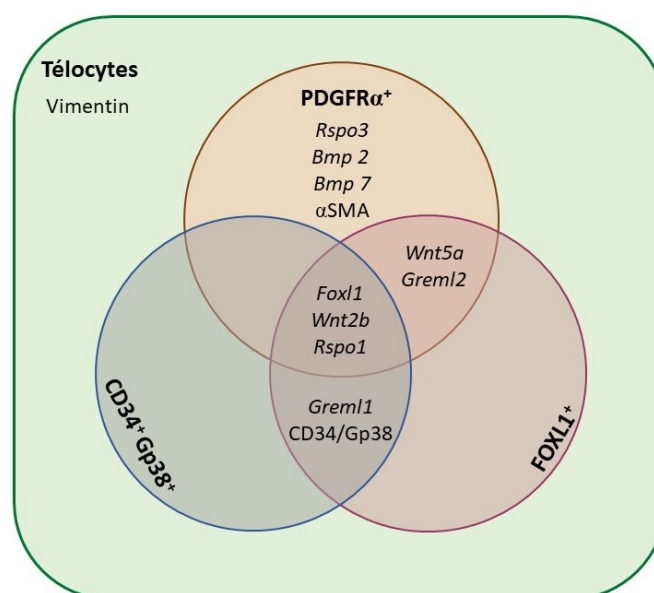


Figure 6. Schéma distinguant les facteurs de la niche produits par les différents sous-types de cellules mésenchymateuses sub-épithéliales.

Ce schéma permet de visualiser les résultats publiés dans les deux dernières années visant à identifier un marqueur des cellules mésenchymateuses produisant les facteurs de la niche des cellules souches.

1.4 Les voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie intestinale

1.4.1 La voie de signalisation des BMPs

Les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) ont été découvertes dans les années 1960 pour leur rôle dans la formation d'os ectopique (Urist, 1965). Les BMPs appartiennent à la superfamille du TGF- β (*Transforming growth factor β*) et sont d'importants morphogènes pour l'embryogénèse et le développement ainsi que pour le maintien de l'homéostasie de tissu adulte comme l'os ou le système vasculaire (Bobacz et al., 2003; Huang et al., 2009). Il existe 15 BMPs, groupés dans 4 sous-classes selon l'analyse des similarités de séquence (Mueller et Nickel, 2012). La voie de signalisation des BMPs peut agir de deux façons: de manière canonique et non-canonique. La voie des BMPs canonique repose sur la liaison d'un ligand à des récepteurs situés à la membrane plasmique de la cellule. Le ligand va former un complexe hétérotétramérique avec deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II. Il existe 7 récepteurs de type I, et 4 récepteurs de type II (Wang et al., 2014). Les récepteurs de type II possèdent une queue cytoplasmique ayant une activité sérine-thréonine kinase (Heldin et al., 1997). Les récepteurs BMPR1A, BMPR1B et BMPR2 sont spécifiques aux ligands BMPs. Dans l'intestin sont exprimés BMP2/4/5/6/7 ainsi que BMPR1A et BMPR2 (Shoshkes-Carmel et al., 2018). Suite à la formation du complexe, le récepteur de type II va transphosphoryler le récepteur de type I, qui va pouvoir phosphoryler et ainsi activer les R-SMADs (effecteurs de la voie associés au récepteur). Pour la voie des BMPs les R-SMADs sont les SMADs 1, 5 et 8. Une fois phosphorylés, les R-SMADs vont pouvoir lier le co-SMAD (SMAD4) et ce complexe va transloquer au noyau et agir comme facteur de transcription. Les cibles transcriptionnelles du complexe Smad4/RSmad sont mal connues dans l'intestin. La Figure 7 schématise la voie de signalisation canonique des BMPs.

Le TGF- β va quant à lui lier les récepteurs T β R-I et T β R-II, ce qui va activer les R-Smads. Dans la signalisation du TGF β , les R-Smads sont Smad2 et Smad3. Une fois associé avec le co-Smad (Smad4) le complexe va agir comme facteur de transcription.

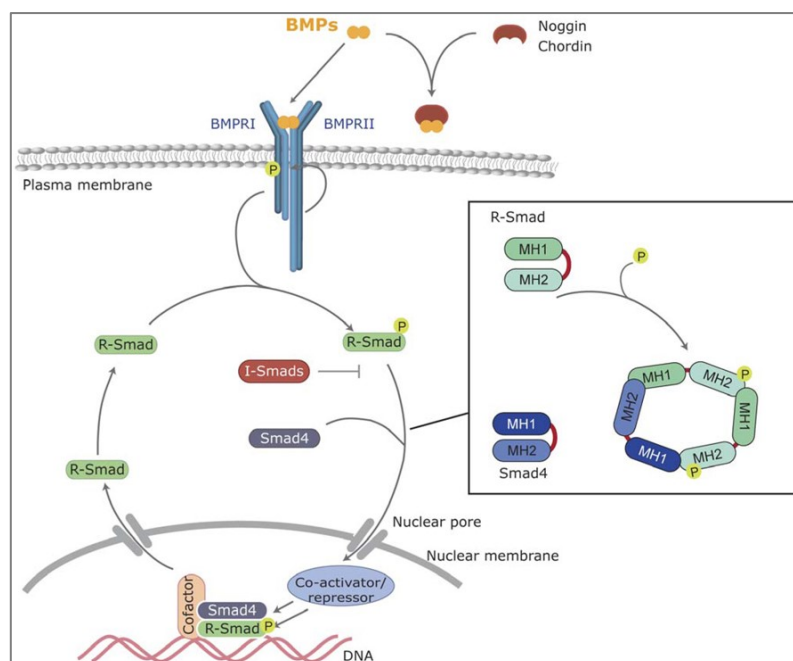


Figure 7. Schéma de la voie de signalisation des BMPs canonique. La liaison du ligand BMP au récepteur entraîne la phosphorylation des R-SMADs, puis leur association au co-SMAD. Ce complexe transloque au noyau et va agir comme facteur de transcription. Image provenant de l'article publié par Gámez et collaborateurs en 2013 (Gámez et al., 2013). Image libre de droits.

La voie non-canonique est indépendante des SMADs. Il a été démontré que les BMPs peuvent activer des voies de signalisation telles que ERK et p38 / JNK MAPKinase (Broege et al., 2013; Yamaguchi et al., 1999) de manière non-canonique. Les protéines intermédiaires ne sont pas connues. Dans des ostéoblastes, il a été montré que cette voie non-canonique peut activer des cibles comme c-JUN et c-FOS, qui vont activer l'expression de gènes tels que l'alcaline phosphatase, la fibronectine et le collagène 1 (Lai and Cheng, 2002). La voie non canonique des BMPs peut activer les voies PI3K/Akt, RhoGTPases via LIMK1 (Shimizu et al., 2012; Thériault et al., 2007). La voie PI3K/Akt entraîne l'activation de la voie mTOR, impliquée dans la synthèse protéique (Lamouille and Derynck, 2007). Les RHO-GTPases comme RHOA sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Jaffe and Hall, 2005). Ces voies de signalisation impliquées dans le remodelage du cytosquelette et la production protéique favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse (Thériault et al., 2007). La voie des BMPs non-canonique est schématisée à la Figure 8.

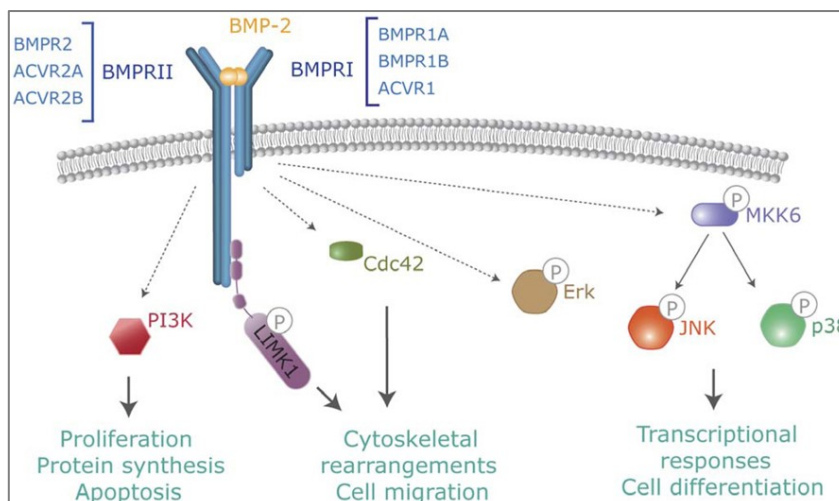


Figure 8. Schéma de la voie non-canonique des BMPs.

La liaison du ligand aux récepteurs va entraîner l'activation de voies de signalisation indépendamment des SMADs. Ces voies sont impliquées dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Image provenant de l'article publié par Gámez et collaborateurs en 2013 (Gámez et al., 2013). Image libre de droits.

Afin de réguler la voie, plusieurs niveaux de contrôle sont présents aux niveaux extra et intracellulaires. Au niveau extracellulaire, des protéines peuvent antagoniser les ligands BMPs en les liant directement, empêchant ainsi leur association aux récepteurs. Certaines de ces protéines sont NOG, GREML et Chordin (Brazil et al., 2015). L'expression de *Noggin* et *Gremlin* est activée par la voie des BMPs, formant ainsi une boucle de rétro-action négative. Le pseudo-récepteur transmembranaire BAMBI est un régulateur négatif de la voie des BMPs et du TGF- β puisqu'il empêche la formation du complexe des récepteurs de type I et II (Onichtchouk et al., 1999). Au niveau intracellulaire, les I-SMADs (SMADs inhibiteurs, SMADs 6 et 7) vont amener un rétrocontrôle négatif de la voie en bloquant l'association des R-SMAD avec le co-SMAD (Heldin et Moustakas, 2012). De plus, des phosphatases telles que PP1 et PP2A vont inhiber la voie en déphosphorylant les récepteurs et les R-Smads (Bengtsson et al., 2009).

La voie des BMPs est impliquée dans diverses maladies, cependant l'intérêt sera ciblé sur le cancer dans ce mémoire. Chez l'humain, des mutations dans les cellules germinales des gènes *BmpR1a* et *Smad4* ont été rapportées chez des patients atteints du syndrome de polypose juvénile. Des mutations acquises au cours de la vie dans certains gènes de la voie comme

Smad4 ont été observées chez des patients atteints de cancer colorectal (CCR) sporadique. La voie des BMPs est surtout associée à une inhibition de la prolifération cellulaire. Dans le cas de cancer, une mutation dans cette voie la rendant défectueuse entraîne donc l'hyperprolifération des cellules (Katagiri et Watabe, 2016). La voie des BMPs agit donc comme suppresseur de tumeur. Les mutations n'arrivent pas seulement dans des effecteurs de la voie. En effet, le syndrome de polypose héréditaire mixte (*Hereditary mixed polyposis syndrome*, HMPS) est dû à une duplication du gène codant pour GREML1, un antagoniste de la voie. Cela entraîne une inhibition anormale de la voie, et la formation de polypes colorectaux d'histologie mixte. Davis et collaborateurs ont montré l'effet de la surexpression de GREML1 chez la souris. Ils observent l'apparition d'adénomes de type festonné (Davis et al., 2015).

De précédents travaux dans le laboratoire de la P^{re} Nathalie Perreault ont montré le rôle de la signalisation des BMPs dans l'épithélium et le mésenchyme intestinal en invalidant le récepteur *Bmpr1a* dans les cellules épithéliales ou mésenchymateuses FOXL1⁺. Dans l'étude effectuée par Auclair et collaborateurs, l'invalidation épithéliale de la voie entraîne une hyperprolifération épithéliale ainsi qu'une altération dans la différenciation et la fonction des cellules calciformes dans l'intestin (Auclair et al., 2007). Au niveau mésenchymateux, l'étude effectuée par Allaire et collaborateurs a permis d'élucider le rôle de la voie dans l'homéostasie colique. La composition du stroma des souris mutantes est modulée et forme un environnement toxique favorisant l'apparition de néoplasie (Allaire et al., 2016).

Ces résultats montrent l'importance de la voie des BMPs dans le maintien de l'homéostasie intestinale, mais aussi dans le cancer colorectal.

1.4.2 La voie de signalisation Wnt canonique

Après la découverte du premier facteur WNT en 1982 par Nusse et Varmus, la voie Wnt a été le sujet de nombreuses recherches de par son importance du développement jusqu'au cancer (Krausova et Korinek, 2014). Cette voie de signalisation fait partie des grandes voies

impliquées dans la croissance et le développement comme, entre autres, les voies des BMPs, du TGF- β et de Notch.

Il existe trois voies impliquant les Wnts: la voie canonique Wnt- β -caténine, la voie non-canonique polarité planaire cellulaire et la voie Wnt/ Ca^{2+} (Clevers, 2006). Ce mémoire se concentre particulièrement sur la voie Wnt canonique car des dérégulations dans cette voie ont été impliquées dans le développement de cancer (Reya et Clevers, 2005). La voie Wnt canonique est schématisée à la Figure 9. Brièvement, en absence de ligand WNT, la voie est inactive et ainsi la β -caténine est séquestrée dans un complexe formé de l'Axine, d'APC (*adenomatous polyposis coli*), de GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3*), de Dvl (*Dishevelled*) et de CK1 α (*casein kinase 1*). L'Axine permet de lier la β -caténine avec APC. GSK3 β et CK1 α sont des kinases qui vont pouvoir phosphoryler la β -caténine lorsqu'elle est dans le complexe. L'ubiquitine ligase β TrCP (*Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase*) va ensuite lier la β -caténine phosphorylée, et l'ubiquitinyler ce qui va envoyer la β -caténine au protéasome pour dégradation. Suite à la liaison d'un ligand WNT aux récepteurs Frizzled et LRP5/6 (*low density lipoprotein receptor-related protein*), LRP5/6 va être phosphorylé et l'Axine va pouvoir s'y lier. Cette interaction va déstabiliser le complexe de dégradation, rendant la β -caténine libre et active. Le récepteur LRP phosphorylé va aussi inhiber la kinase GSK3, aidant à la stabilisation de la β -caténine. La β -caténine non-phosphorylée et active va pouvoir transloquer au noyau, se lier à TCF/LEF1 (*Transcription Factor, Lymphoid Enhancer Factor*) à la place de Groucho et agir comme activateur transcriptionnel (Nusse and Clevers, 2017).

Chez la souris, il existe 19 Wnts, 10 récepteurs Fzd et 2 LRPs. Sept Wnts sont exprimés dans l'intestin en plus de 4 récepteurs Fzd et de 2 co-récepteurs LRPs. Le mésenchyme gastrointestinal exprime Wnt2b, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b alors que l'épithélium exprime Wnt3, Wnt6 et Wnt9b (Gregorieff et al., 2005). LRP5/6 sont exprimés par les cellules épithéliales intestinales, tout comme FZD4/5/6 et 7 (Gregorieff et al., 2005).

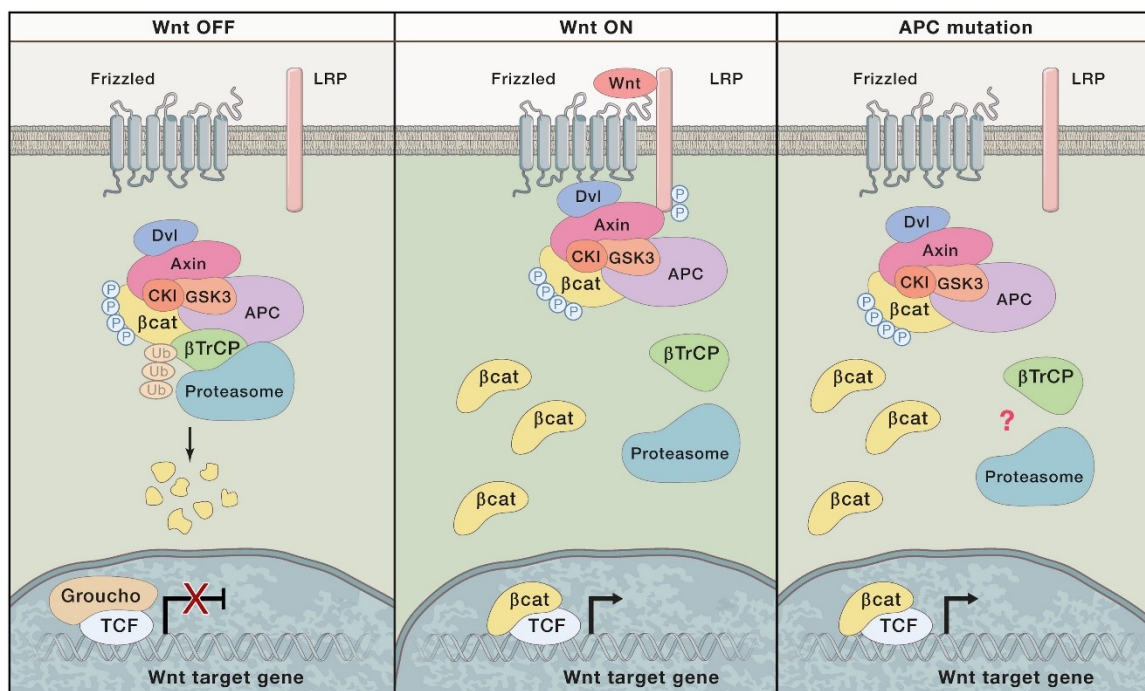


Figure 9. Schématisation de la voie Wnt canonique.

À gauche: la voie de Wnt inactive, la β -caténine est séquestrée et phosphorylée par le complexe permettant sa dégradation par le protéasome. Au centre: la voie de Wnt active, liaison du ligand aux récepteurs et libération de la β -caténine. La β -caténine transloque au noyau, s'associe avec TCF et LEF et ensemble ils agissent comme facteur de transcription. À droite: exemple de la mutation dans *APC*. La voie est sur-activée car le complexe de dégradation de la β -caténine est non-fonctionnel. Image issue de l'article de revue écrit par Nusse et Clevers en 2017 (Nusse and Clevers, 2017). Licence #4373820420985.

Les cibles de la voie de Wnt comprennent des régulateurs du cycle cellulaire tels cMYC et Cycline D1 (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999). En effet, cMYC va pouvoir activer l'expression de Cycline D1 et réprimer celle de P21 et P27 (Niehrs and Acebron, 2012). La Cycline D1 va inhiber le complexe Rb, permettant ainsi l'accumulation de la Cycline E. L'accumulation de la Cycline E est l'évènement permettant à la cellule de passer le point de contrôle G1/S et donc d'entrer dans la phase S du cycle cellulaire. Les protéines P21 et P27 sont des inhibiteurs du cycle cellulaire puisqu'ils inhibent les Cyclines D et E. L'action de la voie Wnt va entraîner l'inhibition de P21 et P27, permettant l'activité de la cycline E et donc la progression de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire (Niehrs and Acebron, 2012). Ces caractéristiques font de la voie Wnt un régulateur crucial de la prolifération cellulaire. Suite à ces découvertes, de nombreuses mutations dans cette voie ont été associées avec le

développement du cancer puisqu'une suractivation de la voie va entraîner la prolifération incontrôlée des cellules (Reya and Clevers, 2005).

Le rôle de la voie de Wnt- β -caténine dans l'intestin a été étudié en 2007 par Fevr et collaborateurs. Ils ont utilisé un modèle de souris transgénique permettant la délétion conditionnelle de la β -caténine dans l'épithélium intestinal. Ils ont déterminé que la voie de Wnt était la plus active dans le fond des cryptes, et plus particulièrement dans la zone où se situent les cellules souches. Suite à l'activation de la délétion de β -caténine, les souris meurent dans les 6 jours à cause d'une absence d'épithélium intestinal. Dès 4 jours après le début de la délétion, les cryptes sont absentes chez les souris mutantes montrant l'importance de la voie de Wnt pour le maintien des cellules souches et de leurs cellules filles prolifératives. Ils observent que les cellules sont bloquées en phase G1, elles arrêtent donc de proliférer. Ainsi, en absence de cellules pour le régénérer, l'épithélium est détruit (Fevr et al., 2007). Cette étude souligne donc l'importance de la voie Wnt- β -caténine dans le maintien de l'homéostasie intestinale.

La régulation de la voie Wnt se fait via différents types d'inhibiteurs: certains lient le ligand l'empêchant ainsi de lier le récepteur alors que d'autres lient les récepteurs directement. Par exemple, Notum va retirer la queue palmitoylée des ligands WNT, rendant leur liaison à Frizzled impossible (Kakugawa et al., 2015). D'autres molécules, comme DKK (*Dickkopf*) lient le récepteur LRP ce qui empêche la dimérisation de LRP et Frizzled. Les molécules sFRPs (*secreted Frizzled-related proteins*) peuvent quant à elles lier les ligand WNT et le récepteur Frizzled séparément, lui donnant la capacité de bloquer la voie Wnt canonique (Cruciat and Niehrs, 2013). Certaines cibles transcriptionnelles de la voie Wnt peuvent créer une boucle de rétroaction négative. C'est le cas de RNF43 (*Ring Finger Protein 43*) et ZNRF3 (*Zinc And Ring Finger 3*). Ces cibles de la voie Wnt- β -caténine induisent la poly-ubiquitinylation du récepteur Frizzled, l'amenant à être endocyté puis dégradé (Hao et al., 2012; Koo et al., 2012).

Le signal de la voie Wnt peut être amplifié à l'aide de molécules telles que la RSPO. Il en existe plusieurs sous-types: RSPO1, 2 et 3. Tous sont en mesure de lier les récepteurs LGR et ensemble ils peuvent lier les protéines RNF43 et ZNRF3 entraînant l'endocytose de ce complexe, et empêchant ainsi l'action inhibitrice de RNF43 et ZNRF3 sur la voie (de Lau et

al., 2014). Les récepteurs LGR sont eux-mêmes des cibles transcriptionnelles de la voie Wnt- β -caténine (de Lau et al., 2014). Ceci montre à quel point la voie Wnt se régule intrinsèquement.

Au niveau pathologique, une mutation entraînant l'activation de la voie Wnt canonique va entraîner l'hyper-prolifération cellulaire, et donc éventuellement le cancer. Au niveau du cancer colorectal, la mutation dans la voie Wnt canonique est souvent une étape initiatrice de la cascade d'événement menant la muqueuse saine à un carcinome invasif (Krausova et Korinek, 2014). Le schéma de la Figure 9 présente l'effet de la mutation d'APC: β TrCP n'est plus en mesure de lier le complexe de dégradation. La β -caténine s'accumule donc dans le cytoplasme et transloque au noyau et active la transcription des gènes cibles comme cMYC.

1.4.3 La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch régule de nombreux processus cellulaires via contact cellule-cellule. En effet, le ligand est membranaire sur une cellule et va lier le récepteur membranaire sur la cellule adjacente. Quatre types de récepteurs NOTCH sont présents chez l'humain: NOTCH 1, 2, 3 et 4. Il existe 3 ligands de la famille des DLL (DLL1/3/4) (*Delta like ligand*) et 2 ligands de la famille Jagged (JAG1/2) (Kangsamaksin et al., 2015). Dans l'intestin, les principaux récepteurs sont NOTCH 1 et 2, les principaux ligands sont DLL1 et 4. La liaison du ligand au récepteur entraîne premièrement le clivage d'une portion extracellulaire du récepteur par la protéine ADAM10 (*ADAM Metallopeptidase Domain 10*). Ensuite, le clivage d'une portion intracellulaire du récepteur est effectué par le complexe γ -sécrétase. La portion clivée est appelée NICD (*Notch intracellular domain*) (Kopan and Ilagan, 2009; Tsai et al., 2014). NICD va ensuite transloquer au noyau et s'associer avec RBPJ (*Recombining binding protein suppressor of hairless*), puis ce complexe va recruter MAML (*Mastermind-like*), un co-activateur transcriptionnel. Ce complexe va entraîner l'activation de la transcription de gènes cibles de Notch, tels que *Hes1* (*Hes Family BHLH Transcription Factor 1*) ou *Olfm4* par exemple (Demitrack and Samuelson, 2016). La Figure 10 schématise la voie Notch.

Plusieurs façons de réguler la voie Notch ont été décrites par F. Schweisguth dans un article de revue (Schweisguth, 2004). Puisque l'activation de la voie Notch repose sur le clivage de son récepteur, un récepteur ne peut transmettre un signal qu'une seule fois. Cela apporte un niveau de régulation important. De plus, la voie requiert très peu de molécules intermédiaires, donc les cibles à réguler sont limitées. Le récepteur NOTCH et les ligands peuvent subir de multiples fucosylations effectuées par la protéine POFUT1 (*O-Fucosyltransferase 1*). Ces modifications sont nécessaires pour l'activation de la voie (Okajima and Irvine, 2002). La voie Notch peut aussi être régulée par l'endocytose de son récepteur et la subséquente dégradation de celui-ci dans le lysosome. NICD peut aussi être ciblé et être dégradé par le protéasome, entraînant l'inhibition de la voie. En effet, il a été montré que Sel-10 (*F-Box And WD Repeat Domain Containing 7*) peut lier NICD et ainsi médier son ubiquitination et son adressage au protéasome (Öberg et al., 2001).

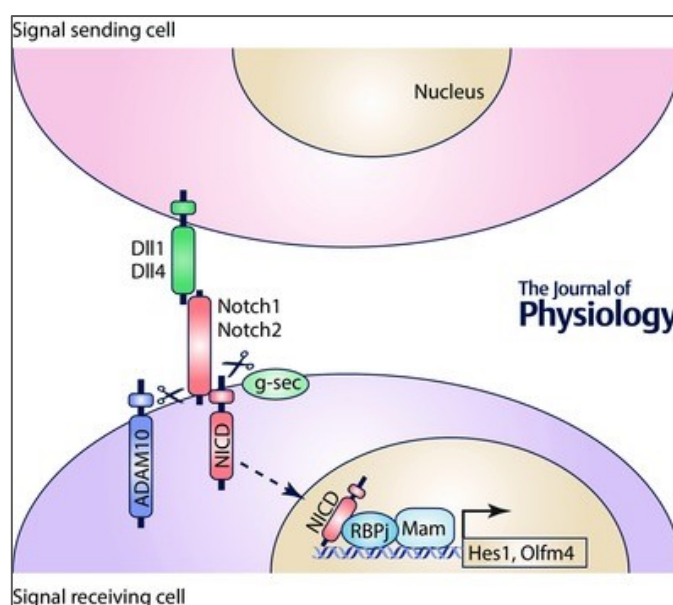


Figure 10. Schématisation de la voie Notch.

La voie Notch repose sur un contact cellule-cellule. Les ligands DLL peuvent lier les récepteurs NOTCH, puis le récepteur sera clivé. La portion intracellulaire clivée (NICD) va transloquer au noyau et activer la transcription de gènes cibles. Image tirée de la revue écrite par Demitrack et Samuelson en 2016. Licence #4374841212787.

La voie Notch a un rôle central dans la différenciation cellulaire. En effet, tel qu'indiqué dans la Figure 2, la balance entre l'activation et l'inhibition de la voie va amener les cellules

progénitrices vers un caractère absorbant ou sécrétoire. Si la voie Notch est active, la cellule progénitrice va se différencier en cellule absorbante. Au contraire, si la voie Notch est inactivée, la cellule progénitrice va se différencier en cellules de la lignée sécrétoire. Cela repose sur la balance de deux protéines: HES1 et ATOH1 (anciennement nommée MATH1, et nommée HATH1 chez l'humain). Dans des cellules où la voie Notch est active, *Hes1* est exprimé et HES1 va pouvoir lier le promoteur d'*Atoh1*, empêchant ainsi l'expression d'*Atoh1* (Zheng et al., 2011). ATOH1 est un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes propres aux cellules de la lignée sécrétrice. Leurs rôles ont été démontrés dans plusieurs modèles murins. L'inhibition de la voie Notch par délétion génétique ou par l'utilisation d'inhibiteurs entraîne un déséquilibre en faveur des cellules sécrétrices: les intestins des souris présentent un nombre augmenté de cellules caliciformes, de Paneth et entéroendocrines (van Es et al., 2005). Au contraire, l'activation de la voie entraîne une diminution du nombre de cellules sécrétrices en faveur des cellules absorbantes (Stanger et al., 2005). Puisque la voie Notch nécessite deux cellules adjacentes, les cellules progénitrices régulent entre elles l'activité de la voie. En effet, si la cellule exprimant ATOH1 exprime aussi les ligands DLL1 et DLL4, la cellule adjacente exprimant le récepteur va voir sa voie Notch activée, et donc exprimer HES1. C'est pourquoi les cellules absorbantes sont entourées de cellules sécrétrices (Demitrack and Samuelson, 2016).

1.4.4 Interactions entre les voies BMP, Wnt et Notch

Les voies de signalisation BMP, Wnt et Notch participent toutes au maintien de l'homéostasie des tissus, indépendamment les unes des autres mais aussi de manière complémentaire (Bertrand et al., 2012). En effet, ces voies de signalisation communiquent, convergent vers des points d'intersection communs. La première évidence d'une telle communication a été réalisée chez la *Drosophile* en 1996. Les auteurs ont trouvé que la voie Notch pouvait réguler la voie de signalisation Wingless (homologue de la voie Wnt) via Dvl. En effet, la portion cytoplasmique du récepteur Notch pouvait lier et ainsi bloquer Dvl, activant donc la voie Wingless (Axelrod et al., 1996). Il a aussi été élucidé que la voie des BMPs et celle de Wnt étaient liées via la voie PTEN/PI3K/AKT. En effet, le signal de la voie

des BMPs va pouvoir entraîner l'activation de PTEN, inhibant ainsi AKT. Une diminution d'activité d'AKT a été associée à une baisse d'activité de la β -caténine. Ces résultats indiquent donc que l'activité de la voie des BMPs est associée à une perte d'activité de la voie Wnt via PTEN/AKT (He et al., 2004).

1.5 Le cancer colorectal

Avec 26 800 nouveaux cas en 2017, le cancer colorectal (CCR) est le 2ème cancer le plus diagnostiqué au Canada (statistiques de la Société Canadienne du Cancer). Quatre-vingts pour cent de ces cancers sont dus à des mutations de novo, dites sporadiques, et 20% sont dus à des mutations héréditaires. Il est donc important d'approfondir les connaissances scientifiques sur le sujet.

1.5.1 Description de la pathologie

Le cancer est associé à une prolifération non-contrôlée de cellules d'un tissu, qui perdent de leur fonctionnalité. Dans le colon, le cancer débute avec des cryptes aberrantes, puis des polypes bénins appelés adénomes qui vont éventuellement pouvoir évoluer vers un adénocarcinome, puis un carcinome invasif et éventuellement former des métastases. Les métastases sont principalement observées dans le foie. Cette succession d'événement est nommée carcinogénèse. Les étapes moléculaires de la carcinogénèse sont en partie connues: la première modélisation de ces étapes a été réalisée par Vogelstein et Fearon en 1990 puis a été bonifiée au fur et à mesure des nouvelles découvertes (Fearon et Vogelstein, 1990). Cette modélisation met l'accent sur l'accumulation de mutations au sein des polypes qui va les faire passer d'un stade bénin à un stade malin. Les mutations les plus fréquentes sont la perte de fonction d'APC et de P53, ainsi qu'un gain de fonction de KRAS. Le rôle d'APC a été décrit à la section 1.4.2: il entraîne une suractivation de la voie Wnt- β -caténine et donc l'hyperprolifération des cellules portant la mutation. Une mutation d'un allèle du gène *APC* entraîne l'apparition du syndrome de polypose adénomateuse familiale chez les patients; ce syndrome fait donc partie des 20% de cancers héréditaires. Ces patients développent de nombreux polypes bénins dans le colon, mais qui, sans traitement, ont un haut risque de

devenir malins et ainsi de causer un CCR (Young et al., 2013). Un autre type héréditaire est le syndrome de polypose juvénile, causé par une mutation dans la voie des BMPs, comme dans le récepteur BMPR1A ou la protéine SMAD4. Les patients développent des polypes de type hamartomateux, bénins mais ont un haut risque de développer un CCR au cours de leur vie (Calva-Cerqueira et al., 2010).

La classification des différents CRC a beaucoup évolué pour arriver à un consensus en 2015: la classification CMS (*Consensus Molecular Subtypes*). Grâce aux approches du séquençage du génome des cellules tumorales, ils ont pu dégager 4 classes de cancer avec des caractéristiques moléculaires particulières (Guinney et al., 2015). La classe CMS1 est caractérisée par l'instabilité des microsatellites et une infiltration importante de cellules immunitaires. La classe CMS2 est appelée canonique car les voies de Wnt et Myc sont touchées. Le CMS3 est de type métabolique et le CMS4 est de type mésenchymateux, avec forte infiltration du stroma, activation du TGF β et angiogenèse. Ces caractéristiques rendent le CMS4 le pire en matière de survie des patients.

La MEC est aussi très importante dans le développement du CRC et sa progression. Dans les tumeurs, la MEC est remodelée et plus rigide. La rigidité de la matrice a été corrélée avec la progression et l'agressivité tumorale (Samani et al., 2007). Les métalloprotéinases (MMP) et la lysyl-oxydase (LOX) régulent le microenvironnement tumoral ainsi que la réponse immunitaire, la réparation des blessures, la transition épithélio-mésenchymateuse et la fibrose (Vannucci, 2015). Wei et collaborateurs ont observé une augmentation de l'expression de LOX dans des tumeurs de plus haut grade. Ils ont donc montré que LOX (protéine responsable de la formation de liens entre les molécules de collagène) entraîne une augmentation de la rigidité matricielle et fait progresser la gravité des tumeurs colorectales chez les patients. (Wei et al., 2017). Il est donc de plus en plus clair que les cellules du stroma et la matrice participent à la progression du CCR.

1.5.2 Modélisation chez les souris

L'utilisation de souris transgéniques a permis d'évaluer l'importance de certaines protéines et voies de signalisation dans le développement du CCR. Pour modéliser le syndrome de polypose adénomateuse familiale, la souris *Apc*^{Min/+} a été développée et est très largement utilisée dans la littérature. Cette souris a un allèle muté du gène *Apc* et va développer de nombreux polypes dans l'intestin, et peu dans le colon. Pour développer un polype, il faut d'abord que la cellule perde son 2^{ème} allèle du gène, par un mécanisme appelé perte d'hétérozygotie. Ce mécanisme est le même que celui observé chez les patients puisqu'ils n'ont hérité que d'un seul allèle muté. Cependant la majorité des polypes sont observés dans l'intestin alors que chez les patients ils sont localisés dans le colon. De plus, les polypes chez la souris sont des adénomes et ne progressent jamais, contrairement à ce qui est observé chez l'humain. La souris *Apc*^{Min/+} permet donc de modéliser l'initiation de la polypose mais pas la carcinogénèse (Young et al., 2013). Cependant la souris *Apc*^{Min/+} est encore beaucoup utilisée en recherche car il est possible de générer une souris ayant *Apc* muté ainsi qu'un autre gène d'intérêt muté. Ces modèles appelés double-mutants permettent d'observer la synergie entre deux mutations et de modéliser les mutations additionnelles qui ont lieu dans les polypes humains. Par exemple, l'ajout de la mutation dans le gène *Smad3* entraîne l'augmentation du nombre de polypes, une accumulation de polypes dans le colon distal et l'apparition d'adénocarcinomes et de carcinomes chez les souris à deux mois. Ce modèle modélise donc ce qui est observé chez les patients atteints du syndrome de polypose familiale et prouve l'importance de la voie du TGFβ dans l'avancement du CCR (Sodir et al., 2006). Au niveau de la voie des BMPs, des mutations dans *SMAD4* et *BMPR1A* ont été découvertes chez 45% des patients atteints du syndrome de polypose juvénile (Calva-Cerqueira et al., 2010; Howe et al., 2001; Wambach et Barnard, 1999). Ces mutations germinales prédisposent les patients à développer des polypes de type hamartomateux. De plus, les patients ont 50% de risque de développer un CCR au cours de leur vie (Calva-Cerqueira et al., 2010). Ainsi la voie des BMPs possède un rôle important dans le développement du CCR.

1.6 Hypothèse et objectifs de recherche

Les cellules mésenchymateuses FOXL1⁺ participent à la production de facteurs de la niche des cellules souches intestinales (Aoki et al., 2016; Shoshkes-Carmel et al., 2018). La voie des BMPs dans les cellules épithéliales a un rôle important dans le maintien de l'homéostasie au niveau des cellules souches et de leur devenir (Auclair et al., 2007; Qi et al., 2017). Allaire et collaborateurs ont montré que la délétion de la voie des BMPs dans les télocytes FOXL1⁺ entraîne le développement de la polypose dans le colon des souris âgées de 1 an (Allaire et al., 2016). Cependant, le rôle de la voie des BMPs dans les télocytes FOXL1⁺ sur l'épithélium intestinal et les cellules souches n'a pas été exploré.

Hypothèse: La perte de la voie de signalisation des BMPs dans les télocytes FOXL1⁺ dérégule la production des facteurs de la niche mésenchymateuse, affectant ainsi les cellules souches, leur devenir et favorise la tumorigenèse.

Pour répondre à cette hypothèse, un modèle de délétion conditionnelle de type Cre-loxP permettant la délétion du récepteur *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺ a été utilisé, ainsi qu'un modèle de type double-mutant *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}*Apc*^{Min/+} afin de répondre à la question sur la tumorigenèse. Ce modèle de souris double-mutantes permettra d'analyser la réaction croisée entre la perte de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ et l'augmentation de la voie Wnt canonique.

Le projet a été divisé en quatre objectifs afin de répondre à l'hypothèse de recherche

Objectif 1. Évaluer l'impact de la délétion de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺ sur la composition de la niche des cellules souches intestinales et sur la voie de Wnt.

Objectif 2. Déterminer l'effet de la voie de signalisation des BMPs des cellules FOXL1⁺ sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Objectif 3. Déterminer la capacité de régénération des cellules souches des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

Objectif 4. Évaluer le rôle de la voie des BMPs des cellules FOXL1⁺ dans l'initiation de la polypose.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souris modifiées génétiquement

Les souris sont hébergées selon les normes établies par le comité d'éthique animale de la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé (FMSS) de l'Université de Sherbrooke, en accord avec les normes du Conseil Canadien pour la Protection Animale. Les expériences réalisées sur les souris sont approuvées par le Comité de Recherche Animale de la FMSS (numéro d'approbation FMSS-114-15). La souris transgénique C57BL/6J *Foxl1-Cre* a été donnée par Dr Kaestner (Sackett et al., 2007), la souris 129SvEv-*Bmpr1a*^{Fx/Fx} provient du Dr Mishina (Mishina et al., 2002) et la souris C57BL/6J-*Apc*^{Min} (Silverman et al., 2002) a été achetée chez Jackson Laboratory. Afin de répondre aux objectifs 1 à 3, les croisements suivants ont été réalisés: la souris 129SvEv-*Bmpr1a*^{Fx/Fx} a été croisée avec la souris C57BL/6J afin d'amener ces souris SvEv vers un fond génétique de souris C57BL/6J. Ensuite la souris *Bmpr1a*^{Fx/Fx} a été croisée avec la souris C57BL/6J *Foxl1-Cre* afin de donner des souris *Bmpr1a*^{Fx/+} *Foxl1-Cre*. Ces souris ont ensuite été croisées avec des 129SvEv-*Bmpr1a*^{Fx/Fx} afin de générer des souris mutantes *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ainsi que les souris contrôles n'exprimant pas la Cre-recombinase. Ces souris ont été analysées à l'âge de 3 et 9 mois.

Afin de répondre à l'objectif 4, la souris C57BL/6J-*Apc*^{Min/+} a été croisée avec la souris C57BL/6J *Foxl1-Cre* afin d'obtenir une souris intermédiaire *Foxl1-CreApc*^{Min/+}. Cette souris a été croisée avec la souris 129SvEv-*Bmpr1a*^{Fx/Fx} afin d'obtenir une souris hétérozygote *Bmpr1a*^{Fx/+} *Foxl1-Cre Apc*^{Min/+}, qui sera par la suite mise en accouplement avec la souris 129SvEv-*Bmpr1a*^{Fx/Fx} afin d'obtenir les souris double-mutantes: *Bmpr1a*^{Fx/Fx} *Foxl1-Cre Apc*^{Min/+}, nommées *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Apc*^{Min/+} ainsi que les différents contrôles: la souris dite Contrôle (Cre négative et *Apc* non muté: *Apc*^{WT}), la souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Apc*^{WT}, la souris *Apc*^{Min/+} n'exprimant pas la Cre-recombinase donc *Bmpr1a* non muté et enfin la souris hétérozygote pour *Bmpr1a* et muté pour *Apc*: *Bmpr1a*^{Htz}; *Apc*^{Min/+}. L'analyse des souris de la lignée *Bmpr1a-Apc* a été effectuée à 90 jours.

2.2 Identification des souris et génotypage

Les souriceaux sont identifiés avant l'âge de 10 jours par la coupure d'un de leurs orteils. Cela permet de les identifier puis de les génotyper. L'orteil coupé avec un scalpel est placé dans un tube 1.5mL stérile et conservé à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Pour l'extraction de l'ADN génomique, le protocole utilisé est celui développé par Truett et collaborateurs (Truett et al., 2000). Les orteils sont lysés pendant 1h à 95°C dans 75µl de solution 25mM NaOH, 0.2mM EDTA. Puis 75µl de solution 40mM Tris-HCl pH 5.5 est ajouté afin de neutraliser le pH de la solution et le tube est centrifugé 3min à 4000rpm, ce qui permet de culoter les débris restants. Les extraits sont placés à -20°C jusqu'au génotypage. Le génotypage des souris est effectué par PCR; cela permet de connaître le statut de la souris pour chaque génotype étudié.

Le génotypage des souris pour *Bmpr1a* est réalisé par PCR, dans un volume de réaction final de 10µl selon le protocole fourni par Yuji Mishina. Pour une réaction, le mélange est le suivant: 1µl de tampon Platinum 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.3µl de 50mM MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.2µl 10mM dNTPs, 0.5µl amorce sens diluée à 10µM, 0.5µl d'amorce anti-sens diluée à 10µM, 0.1µl de Platinum TAQ 5U/µl (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3.4µl d'eau stérile et 4µl d'ADN génomique préalablement diluée 1:6 dans de l'eau stérile. Le génotypage pour la *Foxl1-Cre* est réalisé dans une réaction d'un volume de 25µl contenant 2.5µl de tampon 10X (10X *ThermoPol Reaction Buffer*, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 0.5µl de dNTPs 10mM, 1µl d'amorce sens 10µM, 1µl d'amorce antisens 10µM, 1µL de TAQ «maison», 18µl d'eau stérile, et 1µl d'ADN génomique. Afin de génotyper les souris pour le gène *Apc*, le mélange pour une réaction PCR est réalisé comme suit: 2.5µl de tampon 10X (10X PCR Buffer, Qiagen), 0.5µl de dNTPs 10mM, 0.1µl d'amorce sens #033 10mM, 0.625µl d'amorce antisens #758 10mM, 1.25µl d'amorce antisens #034 10mM, 0.125µl de Taq (Qiagen), 18.9µl d'eau stérile et 1µl d'ADN génomique par réaction. Les réactions PCR ont ensuite été réalisées en prenant en compte les températures de fusion des amorces. Les produits PCR sont migrés sur gel d'agarose 1% - 1.2 % (VWR Life Science) contenant 1X de RedSafe (iNtRON Biotechnology, Korea) à 107V pendant 25min dans un tampon TAE (Tris 40mM, acétate 20mM et EDTA 1mM). Toutes les amorces utilisées en PCR proviennent d'IDT Technology, Coralville, IA, USA.

Tableau 1: Liste des amorces utilisées pour le géotypage des souris

Cible	Amorce sens	Tm (°C)	Amorce antisens	Tm (°C)
<i>Bmpr1a</i>	GCAGCTGCTGCTGCAGCCTCC	66.3	TGGCTACAATTTGTCTCATGC	53.4
<i>Foxl1-Cre</i>	GCGGCATGGTGCAAGTTGAAT	59.3	CGTTCACCGGCATCAACGTTT	58.7
<i>Apc</i> ^{Min/+}	033: GCCATCCCTTCACGTTAG	53.0	034: TTCCAATTTGGCATAAGGC	53.2
			758: TTCTGAGAAAGACAGAAGTTA	48.4

2.3 Euthanasie des souris

Les souris sont d'abord injectées d'une solution de chlorhydrate de kétamine (100mg/mL) – xylazine (13mg/ml) (Wyeth, Guelph, ON) en fonction du poids de la souris (1µl/g). Une fois endormie, la souris est euthanasiée par dislocation cervicale selon le protocole autorisé par le Comité d'éthique animale de la FMSS et le CCPA. Les organes sont ensuite rapidement prélevés et mis sur une plaque en verre sur glace.

2.4 Fixation des tissus

Une fois l'intestin de l'animal prélevé, l'organe est divisé selon les sections de l'intestin, puis chaque section est rincée dans du PBS 1X à 4°C (*phosphate buffer saline*). Pour l'intestin, les sections sont coupées et placées directement dans une cassette. Pour le colon, l'organe est ensuite ouvert longitudinalement à l'aide de ciseaux à bouts ronds. Le tissu est de nouveau rincé dans du PBS à 4°C afin de retirer le maximum de contenu luminal (mucus, selles) et le tissu est placé à plat dans la cassette, la couche musculaire vers le bas. Les cassettes sont ensuite immergées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA dans PBS 1X) 4% m/v froid jusqu'au lendemain matin. Après un lavage avec de l'éthanol 70% v/v, les cassettes peuvent être conservés dans l'éthanol 70% v/v à 4°C jusqu'à l'inclusion en blocs de paraffine. La circulation et l'inclusion de ces cassettes en blocs de paraffine sont réalisées par la plateforme de phénotypage animal de la FMSS.

2.5 Microscopie électronique

Afin d'analyser les tissus par microscopie électronique, 1mm de tube digestif est coupé, puis

placé dans du fixateur 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1M pH 7,4 à 4°C 30min, puis recoupé en 4 quarts. Ces morceaux sont ensuite laissés minimum 24h dans le fixateur précédent. Les tissus sont ensuite envoyés à la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de la FMSS afin d'être traités, inclus et coupés. La procédure se déroule comme suit: les échantillons sont rincés deux fois avec du tampon 0,1M cacodylate pH 7,4 puis incubés 90min dans une solution de tétr oxyde d'osmium 1 % dans un tampon cacodylate. Afin d'être déshydraté, le tissu est placé dans des bains contenant une concentration croissante d'éthanol (70, 85, 95 et 100 % v/v) puis dans de l'oxyde de propylène. Le tissu est inclus dans de la résine Epon 812 pendant 48 heures à 60°C afin que la résine polymérise. Le bloc ainsi obtenu est coupé avec un ultramicrotome Leica Ultracut UCT (Leica MicroSystem, Concorde, ON, Canada) en coupes de 80nm d'épaisseur. Le traitement au citrate de plomb et acétate d'uranyle permet d'ajouter du contraste au tissu. Les tissus sont observés à l'aide du microscope électronique à transmission Hitachi H-7500 (Hitachi, Schaumburg, IL, USA).

2.6 Coloration Hématoxyline et Éosine (H&E)

Les lames devant être colorées sont placées à 60°C pendant 15min puis réhydratées selon les étapes décrites dans le tableau 2 ci-dessous. Les lames sont immergées dans une solution filtrée d'hématoxyline de Gill (Poly Scientific; Cat #s210-8oz) pendant 3min, puis rincées 5min sous l'eau courante. Elles sont ensuite placées dans une solution d'alcool acide (EtOH 95% v/v, HCl concentré 1% v/v) pendant 30sec puis rincées sous l'eau 1min, ensuite les lames sont immergées dans une solution d'eau ammoniacale (1g de bicarbonate de sodium et 2mL d'hydroxyde d'ammonium 30% dans 1L d'eau distillée, pH 8.0) pendant 1min avant d'être lavées 5min sous l'eau courante. La coloration à l'éosine est ensuite effectuée en plaçant les lames dans une solution d'éosine (Fluka St. Louis, MA, USA) 1min 30sec avant d'être rincées 5min sous l'eau courante. Les étapes de déshydratation sont ensuite réalisées comme suit : EtOH 100% 3 fois 1min, xylène 2fois 1min. Les lames sont montées avec une goutte de Vectamount (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) et scannées à l'aide d'un scanner multi-lames à lumière visible (Nanozoomer, Hamamatsu, Japon) après avoir séché 24 heures minimum. La coloration H&E est effectuée par la plateforme d'histologie de la FMSS.

Tableau 2: Étapes de réhydratation des tissus

Solution	Durée
Xylène	2x 5 minutes
EtOH 100% v/v	2x 2 minutes
EtOH 95% v/v	1x 1 minute
EtOH 80% v/v	1x 1 minute
EtOH 70% v/v	1x 1 minute
H ₂ O	1x 1 minute

2.7 Coloration des mucines acides par Alcian Bleu

La coloration à l'Alcian Bleu permet de colorer les mucines acides produites par les cellules calciformes. Les noyaux des cellules seront colorés en rose. Les lames sont tout d'abord placées à 60°C pendant 15min puis réhydratées selon les étapes décrites dans le tableau 2. La solution d'Alcian Bleu (1g dans 100mL d'acide acétique 3%, pH 2.5) (Poly Scientific, Bay Shore, NY, USA) est placée sur les lames pendant 30min. Les lames sont rincées à l'eau courante 2min avant d'être contre-colorées dans la solution filtrée de *Nuclear Fast Red* pendant 15min (Electron Microscopy Sciences Hatfield, PA). Les lames sont rincées dans l'eau courante 1min puis déshydratées selon les étapes décrites dans le tableau 3 ci-dessous puis montées et scannées tel qu'indiqué à la section 2.6.

Tableau 3: Étapes de déshydratation des tissus

Solution	Durée
Éthanol 70% v/v	2min
Éthanol 95% v/v	2min
Éthanol 100% v/v	2 fois 2min

Xylène	2 fois 1min
--------	-------------

2.8 Coloration des granules des cellules de Paneth par Best's Carmine

Après 5min à 60°C, les lames sont placées 2 fois 5min dans du xylène puis 2 fois 2min dans de l'EtOH 100% (v/v) puis 2 fois 2min dans du MeOH 100% (v/v). Les lames ainsi déparaffinées sont placées 4h à 56°C dans la solution de méthylation (MeOH 100% (v/v), HCl 0.8% (v/v)). Elles sont ensuite immergées dans du MeOH 100%, 50% et 30% (v/v) 2min à chaque fois, avant d'être rincées à l'eau distillée 2min. Les tissus sont ensuite colorés 10min dans une solution d'hématoxyline de Weigert, puis rincées 10min à l'eau courante et 1min dans de l'eau distillée. Puis elles sont colorées 1h dans la solution de Best's Carmine (Carmine 1% m/v, K₂CO₃ 0.5% m/v, KCl 2.5% m/v, 60% (v/v) d'eau ammoniacale 28%, 30% (v/v) de MeOH 100%). Les lames sont placées dans une solution de rinçage (18% MeOH, 36% EtOH) pendant 1min avant d'effectuer les étapes de déshydratation du tissu: 1min dans de l'EtOH 100%, 2 fois 2 min dans du xylène. Les lamelles de verre sont montées avec du Permount puis scannées tel qu'indiqué dans la section 2.6. La coloration Best's Carmine est effectuée par la plateforme d'histologie de la FMSS.

2.9 Coloration du collagène au Trichrome de Masson

Après 15min à 60°C, les lames sont réhydratées selon les étapes décrites dans le Ttableau 2 puis immergées dans la solution de Bouin (HT-10-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) pendant 15min à 56°C. Les lames sont ensuite rincées à l'eau courante 5min puis elles sont placées 2min dans de l'eau distillée. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de Scalart Fuschine Acide (HT-15-1 Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) 5min à température pièce avant d'être rincées rapidement dans de l'eau distillée. Les lames sont d'abord placées dans une solution d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique (ratio 1 :1) 5min puis immédiatement mises dans une solution d'Aniline bleu (HT-15-4 Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) pendant 5min. La contre coloration est effectuée en immergeant les lames dans une solution d'acide acétique 1% (Poly Scientific, Bay Shore, NY, USA). Les lames sont ensuite déshydratées, montées et scannées tel qu'expliqué dans la section 2.6. La coloration au Trichrome de Masson est effectuée par la plateforme d'histologie de la FMSS.

2.10 Immunofluorescence sur tissus inclus en paraffine

Les blocs de paraffine sont coupés à l'aide d'un microtome en coupes d'une épaisseur de 5µm par la plateforme d'histologie de la FMSS. Les lames sont tout d'abord chauffées à 60°C pendant 20min, puis ré-hydratées tel qu'indiqué dans le tableau 2. Les antigènes sont révélés en immergeant les lames dans l'acide citrique 10mM pH 6.0 dans la cocotte-minute puis en les chauffant au micro-onde 11min 30sec, en les laissant reposer 10min dans l'acide citrique puis en rinçant 10min à l'eau courante. Les lames sont ensuite rincées 5min dans du PBS 1X, la limite des tissus est tracée à l'aide du *Liquid Blocker PapPen* (Daido Sangyo, Saltama, Japan). Le blocage est ensuite réalisé pendant 40min dans une chambre humide avec une solution de PBT (PBS 1X, BSA 0.1% m/v, Triton X-100 0.2% v/v) supplémenté à 2% m/v BSA, et dans certains cas une solution de PBT supplémenté à 2% m/v BSA et 0.1% m/v Gélatine de Poisson. Après le blocage, la solution est retirée de la lame sans rinçage et la solution d'anticorps primaire est ajoutée. L'anticorps primaire est dilué dans le tampon de blocage, les lames sont placées dans une chambre humide le temps de l'incubation. Pour la plupart des anticorps primaires le temps d'incubation est sur la nuit/16-18h à 4°C, voir le Tableau 4 pour le détail des dilutions et du temps d'incubation pour chaque anticorps primaire. Les lames sont ensuite rincées 3 fois 5min dans du PBS 1X avant l'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente. Les anticorps secondaires sont incubés dans le noir 1h40 à température pièce, les dilutions sont indiquées dans le Tableau 4. Les lames sont ensuite rincées au PBS 1X et les contre-colorations suivantes sont effectuées: le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 0.2µg/mL, 1min) permettant de marquer les noyaux des cellules et l'Évan Bleu dilué à 0.1% m/v dans du PBS 1X (quelques immersions) marquant la structure des tissus, les lames sont bien rincées au PBS 1X, puis une fois à l'eau déionisée et enfin séchées dans le noir et montées dans du milieu de montage Immumount (ThermoScientific). Les lames peuvent être conservés à 4°C protégées de la lumière. La prise des images est effectuée à l'aide du microscope à fluorescence Leica DM LB2 (Leica MicroSystem, Concorde, On, Canada), la superposition des images pour les différents filtres est effectuée avec le logiciel ImageJ.

Tableau 4: Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence

	Cible	Dilution	Source animale	Fournisseur, # catalogue
Anticorps primaires	Ki67	1/2	Lapin	Thermofisher, RM-9106-R7
	Lysozyme	1/2500	Lapin	Dako, A0099
	Chromogranine A	1/500	Lapin	Immunostar
	OLFM4	1/500	Lapin	CST, D6Y5A
	SOX9	1/1000	Lapin	Millipore, 5535
	Collagène I	1/175	Lapin	Thermofisher, PA1-85319
	Sucrase-Isomaltase	1/500	Chèvre	Santa Cruz Technology Sc 27-603
Anticorps secondaires	IgG souris (Alexa Fluor 568)	1/250	Chèvre	Invitrogen, A11031
	IgG lapin (Alexa Fluor 488)	1/250	Chèvre	Invitrogen, A21069
	IgG chèvre (Alexa Fluor 488)	1/500	Âne	Invitrogen, A11055

2.11 Immunohistochimie selon le kit de Dako

Les premières étapes sont similaires à celles de l'immunofluorescence. Cependant avant le blocage, les peroxydases endogènes au tissu sont bloquées à l'aide d'une solution de peroxyde d'hydrogène 0.03% pendant 5min. Après l'incubation de l'anticorps primaire (voir tableau 5), les lames sont rincées au PBS 1X puis incubées 1h30 avec l'anticorps secondaire couplé au HRP, inclus dans le kit distribué par la plateforme d'histologie de la FMSS. Après plusieurs rinçages au PBS 1X, la révélation au DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) est réalisée selon les instructions du Kit Dako. Le temps de révélation au

DAB varie selon l'anticorps utilisé. Les contre colorations des lames sont ensuite effectuées comme indiqué dans le Tableau 6 ci-dessous. Puis les lames sont déshydratées (tel qu'expliqué dans le Tableau 3) et montées en ajoutant à une lamelle de verre (VWR, West Chester, PA, USA) une goutte de Vectamount (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) puis elles sont scannées en utilisant le Nanozoomer (Hamamatsu, Japan). Les images sont observées à l'aide du NDP.view2.

Tableau 5: Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie

Cible	Dilution	Source animale	Fournisseur, # catalogue
β -caténine totale	1/5000	Souris	BD Transduction Laboratories, 610154
CD3	1/200	Lapin	Dako
CC3	1/300	Lapin	CST, 9661
BrdU	1/100	Souris	NeoMarker, MS-1058-P1

Tableau 6: Étapes de contre-coloration pour l'IHC

Solution	Durée
Hématoxyline de Harris	5min
Eau courante	2min
Alcool Acide (95% v/v EtOH, 5% v/v d'HCl concentré)	30 secondes
Eau courante	2min
Solution de «Blueing» (2mL d'hydroxyde d'ammonium dans 1L d'eau distillée, pH 10.0)	30 à 60 secondes
Eau courante	5min

2.12 Lyse des tissus pour extraire l'ARN et les protéines

Après le sacrifice de la souris et l'isolation du tube digestif, la section d'intérêt comme l'iléon ou le colon distal est coupée et hachée à l'aide d'une lame de rasoir. Afin d'extraire l'ARN (acide ribonucléique), le tissu ainsi coupé est placé dans un tube de 2mL contenant une bille d'acier inoxydable (Qiagen, MD, USA) et du tampon de dénaturation de la trousse *ToTally RNA* (Ambion, CA, USA). Le volume de tampon de dénaturation varie selon la quantité de tissus à lyser cependant, un volume de 600µl est souvent utilisé. Le tissu est immédiatement lysé, ou bien mis dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'à la lyse. Il est cependant préférable de le lyser immédiatement afin d'éviter la dégradation de l'échantillon. Deux cycles de lyse sont réalisés à l'aide du *TissueLyser LT* (Qiagen, MD, USA): d'abord 3min à 50osc/sec, puis 10min sur glace, et s'il reste des morceaux de tissus non lysés, une autre ronde d'oscillation de 2min à 50osc/sec est réalisée. Les tubes sont placés sur glace 10min avant une centrifugation de 15min, 13000rpm à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est placé dans un nouveau tube et mis dans l'azote liquide puis rangés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN. Le protocole est identique pour l'extraction des protéines, sauf que le tampon de lyse utilisé est du RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, NP-40 1% v/v, Sodium déoxycholate 0.5% m/v, SDS 0.1% m/v) supplémenté d'inhibiteurs (concentrations finales: 0.02µg/µl chacun d'Aprotinine et Leupeptine, 2mM chacun de PMSF et de Na₃VO₄).

2.13 Extraction d'ARN au phénol/chloroforme

Les échantillons d'ARN bruts obtenus à la section 2.12 sont décongelés sur glace avant leur extraction selon le protocole de la trousse *ToTally RNATM* (numéro catalogue AM1910, Ambion, CA, USA). Cette trousse repose sur l'extraction de l'ARN par précipitation au phénol/chloroforme. L'étape de précipitation facultative au chlorure de lithium a été effectuée afin de s'assurer d'obtenir des ARN purs. Le culot final a été resuspendu dans 30µl de solution d'éluion du kit (Elution buffer: Ambion, CA, USA) contenant de l'eau garantie sans RNases et de l'EDTA. Les concentrations des ARN ainsi obtenus sont mesurées à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (ThermoScientific, DE, USA), leur pureté a été évaluée grâce aux ratios A260/A230 et A260/A280.

2.14 Matrisperse

Après sacrifice de la souris et prélèvement de l'iléon, l'organe est ouvert longitudinalement et rincé dans du PBS 1X froid puis coupé en morceaux d'environ 5mm de longueur. Ces morceaux sont placés dans un tube de 15mL contenant 4mL de solution de MatriSperser (*Cell recovery solution*, Corning) puis incubés à plat toute la nuit à 4°C sans agitation. Après incubation, le tube est agité 30min à plat sur glace afin de dissocier le mésenchyme de l'épithélium. Afin de récupérer la fraction mésenchymateuse, le surnageant est retiré et 4mL de MatriSperser est ajouté au mésenchyme restant. Le tube est de nouveau agité 30min sur glace à plat puis le surnageant est retiré, du PBS1X est ajouté et le tube est agité à la main afin de retirer tout l'épithélium restant. Le rinçage au PBS 1X est répété une 2^{ème} fois. Un maximum de 100mg de morceaux restants sont resuspendus dans 450µl de tampon de lyse RLT du kit BioBasic afin d'extraire l'ARN, placés dans un tube 2mL contenant une bille d'acier inoxydable et lysés au TissueLyser LT 2min à 50osc/sec, 10min sur glace puis une 2^{ème} lyse 1min à 50osc/sec. Après incubation sur glace, les échantillons sont centrifugés 15min à 13000rpm à 4°C et congelés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN.

2.15 Extraction d'ARN avec la trousse Bio Basic

Un maximum de 100mg de tissus est lysé dans 450µl de tampon RLT de la trousse *EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep* (Bio Basic, Markham ON, Canada) à l'aide du *TissueLyser LT* (Qiagen, MD, USA) en réalisant une première ronde de lyse de 2min à 50osc/sec, puis une incubation de 10min sur glace et une dernière ronde de lyse d'1min à 50osc/sec. Après cette lyse, aucun morceau ou précipité n'était présent dans l'échantillon, aucune centrifugation n'a donc été effectuée. Ce lysat est congelé à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN. L'extraction de l'ARN a été effectuée selon le protocole de la trousse *EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep* (Bio Basic, Markham ON, Canada). Pour l'élution finale de l'ARN, 30µL d'H₂O stérile sont ajoutés sur la colonne, l'élution est effectuée selon les indications de la trousse. L'ARN ainsi obtenu est dosé au Nanodrop (ThermoScientific, DE, USA) puis conservé à -80°C avant son utilisation.

2.16 DNase sur les ARN extraits et Transcription Inverse

Afin de s'assurer de l'absence d'ADN génomique dans les ARN extraits, une étape de DNase est nécessaire afin de dégrader l'ADN contenu dans les échantillons d'ARN extraits. Dans

un volume de final de 20 μ L, 2 μ g d'ARN est dilué dans de l'eau stérile; 2 μ l de tampon DNase 10X (Roche) est ajouté puis 1U d'enzyme DNase (1 μ l d'enzyme diluée 1:10, Roche). L'échantillon est placé à 37 C pendant 30min puis 1.05 μ l d'EDTA 100mM (5mM final) est ajouté avant de placer l'échantillon à 75 C 10min afin d'inhiber la réaction. Après centrifugation rapide afin de culoter l'ARN au fond du tube, deux aliquots de 10 μ L sont prélevés et un est placé à -80 C alors que le second sera utilisé pour la réaction de transcription inverse.

Les ARNm extraits doivent être transformés en ADNc (ADN complémentaire) afin de pouvoir les quantifier par PCR quantitatif (qPCR). Pour la réaction de transcription inverse, un des aliquots de 10 μ l décrit ci-dessus, contenant donc 1 μ g d'ARN est utilisé.   ce 10 μ l sont ajoutés 4 μ l de tampon AMV-RT 5X (Roche), 1.7 μ l d'eau DEPC, 0.8 μ l de dNTPs 25mM, 2.4 μ l du mélange d'amorces poly-dT 25mM de chaque (IDT Technology), 0.6 μ l d'inhibiteur de RNases (Invitrogen) et 0.5 μ l d'enzyme AMV-RT (10U final, Roche). Ce mélange est incubé 1h dans le bain à 42 C, puis 5min à 95 C afin d'inactiver l'enzyme AMV-RT. Les échantillons sont ensuite dilués 1:10 dans de l'eau stérile, pour un volume final de 200 μ l. Ces ADNc sont conservés à -20 C jusqu'à leur utilisation en qPCR.

2.17 PCR quantitatif

Les réactions de PCR quantitatif (qPCR) sont effectuées selon le protocole établi par Roche pour la trousse FastStart essential DNA Green Master Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA). Afin de doser les échantillons, les mesures sont réalisées en duplicata. Pour un point, le mélange est le suivant: 2 μ l d'ADNc diluée 1:10, 6 μ l d'eau stérile, 10 μ l de *FastStart essential DNA Green Master Kit (Roche)* et 1 μ l de chaque amorce (IDT Technology) diluée à 10 μ M. Les réactions ont été effectuées sur l'appareil *Light Cycler 96 System* (Roche) selon les instructions du fabricant. La mesure de l'expression du gène d'intérêt dans les échantillons est rapportée à celle du gène de référence *Tbp (Tata-box binding protein)*. Les paires d'amorces utilisées sont listées dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7: Liste des amorces utilisées en RT-qPCR

Cible	Amorce Sens	Amorce anti-sens	Amplicon (pb)
<i>Ascl2</i>	CACTAGACAGCATGGGTAAGG	CTGCTTGACTTTTCCAGTTGG	138
<i>Atoh1</i>	CCAGTATCTGCTGCATTCTCC	CAGCTGTTCCCGTACTTTGAC	148
<i>Bmi1</i>	TTTATGCAGCTCACCCGTC	TTTCCGATCCAATCTGCTCTG	149
<i>ChgA</i>	TTTTGCCCTTCTGTGAACA	TCGGAGATGACTTCCAGGAC	78
<i>Ctnnb1</i>	TCAAGAGAGCAAGCTCATCATTCT	CACCTTCAGCACTCTGCTTGTG	115
<i>EphrB2</i>	GGAAGAAACCCTGATGGACTC	GTTTCATGTTCTCGTCGTAGCC	106
<i>EphrB3</i>	CTATCCGCACGTATCAGGTGT	GGTGAACTTCAGTCCACGTA	116
<i>Greml1</i>	CTGGGGACCCTACTGCCAA	TTTGCACCAATCTCGCTTCAG	243
<i>Hes1</i>	CGGCATTCCAAGCTAGAGAAGG	GGTAGGTCATGGCGTTGATCTG	256
<i>HopX</i>	GAGGACCAGGTGGAGATCCT	TCCGTAACAGATCTGCATTCC	188
<i>Lgr5</i>	ATCCAATCTCCTGTCGTCCTT	CACTGGTAAGCAGATGGCATT	147
<i>Lrig1</i>	GAACACCTGAACCTTGGAGAG	CTGCAGCATCCTACCCATTAG	159
<i>Lysozyme</i>	CCAGAACTCTGAAAAGGAATGG	CCAGTATCGGCTATTGATCTGA	167
<i>mTert</i>	AGGGTAAGCTGGTGGAGGTT	GATGCTCTGCTCGATGACAA	233
<i>Noggin</i>	TCAAAGGGCTGGAGTTCTCC	TGAGGTGCACAGACTTGGAT	243
<i>Olfm4</i>	CAGCCACTTTCCAATTTCACTG	GCTGGACATACTCCTTCACCTTA	175
<i>Rspo1</i>	TTCAGCCACAACCTTCTGCAC	GACCACTCGCTCATTTTACA	146
<i>Rspo3</i>	TTGACAGTTGCCCAGAAGGG	CTGGCCTCACAGTGTAACAATACT	76
<i>Smoc2</i>	TCGGCAGAACAAGACCAATAA	CTAGCACACACCAGCAGTATC	179
<i>Sox9</i>	CGGAGGAAGTCGGTGAAGA	GTTTTGGGAGTGGTGGGTG	197
<i>Tbp</i>	GGGGAGCTGTGATGTGAAGT	GGAGAACAATTCTGGGTTTGA	131
<i>Wnt2b</i>	CACCCGGACTGATCTTGTCT	ACCCGAGTTGTGTCATACCC	165

<i>Wnt3</i>	CGCTCAGCTATGAACAAGCA	CACTGTCGTA CTTGTCCTTGAGG	175
<i>Wnt5a</i>	AAGCAAACCAGCTCACCACA	CAGGCCTCGAAAACAACACA	103

Toutes les amorces utilisées sont spécifiques à la souris (*Mus Musculus*) et la température d'hybridation utilisée est toujours 60°C.

2.18 Dosage des protéines extraites de tissus

Les protéines extraites par la méthode détaillée dans la section 2.12 sont dosées par méthode BCA (Acide Bicinchoninique, kit de Pierce BCA Protein Assay kit, Rockford, USA). La solution de détection est préparée en mélangeant 50 parts de réactif A avec 1 part de réactif B du kit, pour un volume de 200µl par puits. Une courbe standard de BSA (Albumine de Sérum Bovin, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) de 8 points, variant de 0µg/mL à 25µg/mL est réalisée à partir de BSA 1mg/mL diluée dans de l'eau. Deux microlitres de chaque échantillon sont dilués dans 23µl d'eau. Dans une plaque 96 puits, 200µl de solution de détection sont ajoutés au 25µl de protéine à doser; chaque échantillon est dosé en duplicata. Après 30min à 37°C, la concentration de chaque échantillon est calculée à partir de la mesure de l'absorbance à 562nm par un lecteur de microplaque (Versamax, Molecular devices).

2.19 Immunobuvardage de type Western des protéines extraites de tissus

Dix microgrammes de protéines dosées sont placés dans 13µl de tampon RIPA (sans inhibiteurs), et additionnés de 5µl de tampon LDS NuPAGE 4X et 2µl d'agent de réduction NuPAGE 10X, pour un volume final de 20µl. Les échantillons sont ensuite chauffés 10min à 72°C, puis centrifugés brièvement.

Le système d'immunobuvardage de type Western utilisé est celui d'électrophorèse sur gel Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA). Les gels utilisés sont des gels NuPAGE d'Invitrogen. La concentration du gel dépend des cibles souhaitées; des gels 10% Bis-Tris et 4-12% Bis Tris ont été utilisés, avec une épaisseur de 1mm. Le marqueur de poids moléculaire utilisé pour s'assurer du poids des protéines cibles est le HiMark Pre-Stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA). Pour la migration du gel, 1L de tampon MOPS ou MES est fait en diluant 50mL de tampon MOPS ou MES 20X dans 1L final d'eau distillée. Ce tampon de migration

sera placé dans la chambre externe du montage dans la cuve de type *Xcell Surelock* Mini Cell (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA). Dans 200mL de ce tampon de migration sont ajoutés 500µl d'antioxydant (NuPAGE, Invitrogen), ce tampon sera utilisé dans la chambre interne du montage. La migration est réalisée à 200V, voltage constant, pendant environ 1h à température pièce (soit environ 20°C). Le temps de migration dépend des protéines cibles. Pour une meilleure séparation protéines il est parfois judicieux de laisser migrer plus longtemps, quitte à perdre les protéines de plus petit poids moléculaire. Après l'électrophorèse complétée, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de PVDF (Roche diagnostic, Indianapolis, IN, USA). Pour le transfert, 1L de tampon de transfert est préparé comme suit : 50mL de NuPAGE 20X transfert buffer (Invitrogen) dans 1L final d'eau distillée, 200mL de ce tampon est additionné de 200µl d'antioxydant. Le tampon de transfert est utilisé pour imbiber les éponges et papiers Whatman nécessaires au montage. Le montage est placé dans la cellules de transfert *XCell II Blot Module* (Invitrogen) et les 200mL de tampon avec antioxydant sont placés dans la chambre interne du montage. De l'eau est ajouté dans la chambre externe. Le transfert d'un gel est réalisé à 30V (constant) pendant 1h. Afin de vérifier l'efficacité du transfert, la membrane est rapidement colorée au Ponceau S (Sigma, St. Louis, MA, USA), puis décolorée à l'eau distillée. La membrane est rincée avec du tampon de rinçage TBS-T (TBS-Tween 0.1%). Le blocage des membranes est fait dans une solution de TBS-T, lait sans gras 5% m/v pendant 1h, à température pièce avec agitation. La membrane est rincée avec du TBS-T plusieurs fois avant l'ajout de la solution d'anticorps primaire (4mL au minimum), incubée toute la nuit à 4°C avec agitation. Les différentes dilutions des anticorps utilisés sont répertoriées dans le Tableau 8. Après 3 rinçages au TBS-T de 10 minutes, une solution de 10mL d'anticorps secondaire dilué dans du TBS-T est ajoutée 45min-1h à température pièce, avec agitation. Se référer au Tableau 8 pour les dilutions utilisées. Après l'incubation, l'anticorps secondaire est rincé 3 fois 10min avec du TBS-T avec agitation. La révélation par chimiluminescence est effectuée avec le kit *ECL solution Western Blotting Detection System TM* (Amersham Bioscience, England) en mélangeant les solutions A et B 1:1, dans un volume final de 1mL par membrane. Après 1min d'incubation, l'excès de solution est retiré et la membrane est placée dans la cassette de révélation. La révélation se fait sur film (HyperfilmTM d'Amersham Biosciences, England). Le film est ensuite scanné et les calculs de densitométrie sont réalisés avec le

logiciel ImageJ (Rasband WS, ImageJ, United States National Institutes of Health, Bethesda, MD) en normalisant le score de la protéine cible avec celui de la β -Actine. La comparaison statistique est effectuée sur GraphPad Prism.

Tableau 8: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunobuvardage

	Cible	Dilution	Source animale	Fournisseur, # catalogue
Anticorps primaires	β -Actine	1/20 000	Souris	Millipore, MAB 1501R
	β -Caténine totale	1/10000	Souris	BD Transduction Laboratories, 610154
	β -caténine active (non-phosphorylée)	1/5000	Lapin	CST, 8814
	Olfm4	1/5000	Lapin	CST, D6Y5A
Anticorps secondaires	α -Souris HRP	1 / 10 000	Cheval	CST, 7076
	α -Lapin HRP	1 / 10 000	Chèvre	CST, 7074

2.20 Analyses statistiques

Afin de quantifier les résultats obtenus par immunofluorescence, ou marquage visible, des décomptes ont été effectués en analysant à l'aveugle un minimum de 10 images par souris. Un minimum de 5 souris de chaque groupe (mutante ou contrôle) a été compté afin d'analyser une population représentative. La moyenne des décomptes pour chaque souris a été comparée à l'aide du test statistique Mann Whitney U puisque le nombre d'échantillons par groupe n'est pas suffisant pour considérer qu'ils suivent une distribution normale. Les résultats représentent la moyenne des deux groupes avec la déviation standard (SD). Pour la comparaison des résultats de qPCR et de densitométrie des immunobuvardages de type Western, la mesure pour chaque échantillon est normalisée par rapport à la valeur du gène de

référence (*Tbp*, *TATA-Binding protein*) ou de la protéine de référence (β -Actine). Ensuite, la moyenne des contrôles est ramenée à 1 afin que les mesures des contrôles représentent 100% d'expression, les moyennes pour les échantillons expérimentaux sont normalisées par rapport à la moyenne des souris contrôles. L'analyse statistique des résultats est aussi mesurée par test statistique Mann Whitney U. Le logiciel d'analyse statistique utilisé est GraphPad Prism.

2.21 Irradiation des souris

Les souris choisies pour être irradiées étaient des souris contrôles (3 mâles et 3 femelles) et des souris mutantes *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} (3 mâles et 3 femelles) âgées entre 90 et 120 jours. Les souris ont reçu une dose d'irradiation de 12Gy sur tout leur corps, à l'aide du Gammacell 3000 (Best Thératronics, Ottawa, ON) à raison de 0.164 Gy/seconde. Les souris ont été pesées matin et soir pendant 5 jours puis sacrifiées le 5^{ème} jour. Elles ont été injectées de 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU labeling reagent, Invitrogen, Frederick, MD, USA) 90min avant leur sacrifice afin de marquer les cellules prolifératives. La dose est de 10 μ l de solution par gramme de poids corporel de l'animal. Le BrdU est un analogue de la thymidine et va être inséré dans l'ADN lors de la réplication de l'ADN, ce qui va donc marquer les cellules en phase S du cycle cellulaire.

2.22 Séquençage d'ARN et analyses statistiques

Le séquençage de l'ARN a été effectué sur des extraits d'iléon de souris contrôles et *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} âgées de 9mois; la totalité du tissu a été lysée (épithélium, mésenchyme et muscle). Les ARN extraits tel que décrit à la section 2.13 ont été analysés par la plateforme de RNomique de la FMSS afin de vérifier leur intégrité et leur qualité. Les échantillons ayant un score d'intégrité (RIN: *RNA Integrity number*) supérieur à 9 ont été sélectionnés pour être envoyés à séquencer. Le séquençage a été effectué par Génome Québec à l'Université McGill, Montréal, Qc, Canada. Les bibliothèques d'ADNc ont été préparées avec la technologie *RNASeq Stranded* de NEB. Le séquençage effectué est de type Illumina HiSeq4000 PE100. Les séquences obtenues ont été alignées au génome murin GRCm38, disponible sur Ensembl par le *Canadian Centre for Computational Genomics*, ces derniers ont aussi réalisé les calculs de normalisation des données, de valeurs statistiques des variations. Les résultats ont été

analysés à l'aide du logiciel GSEA (Gene Set Enrichment Analysis, Broad Institute) afin de comparer l'expression des gènes entre les souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

3. RÉSULTATS

3.1 La délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ entraîne une modification architecturale de l'iléon

Les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et contrôles ont été analysés afin de comparer l'architecture de l'intestin, à 3 mois et plus tard dans la vie de l'animal: à 9 mois. À trois mois, les iléons des souris mutantes présentent une faible dilatation du compartiment mésenchymateux, et quelques fusions de villosités (Figure 11, panneaux supérieurs). Cependant, à 9 mois, l'impact de la délétion de la voie des BMPs a pu installer un phénotype plus important. En effet, comme il est possible de l'observer dans le panneau inférieur de la Figure 11, les villosités sont fusionnées ou dédoublées. Le compartiment mésenchymateux est dilaté dans les iléons des souris mutantes alors que les iléons de souris contrôles présentent une architecture normale.

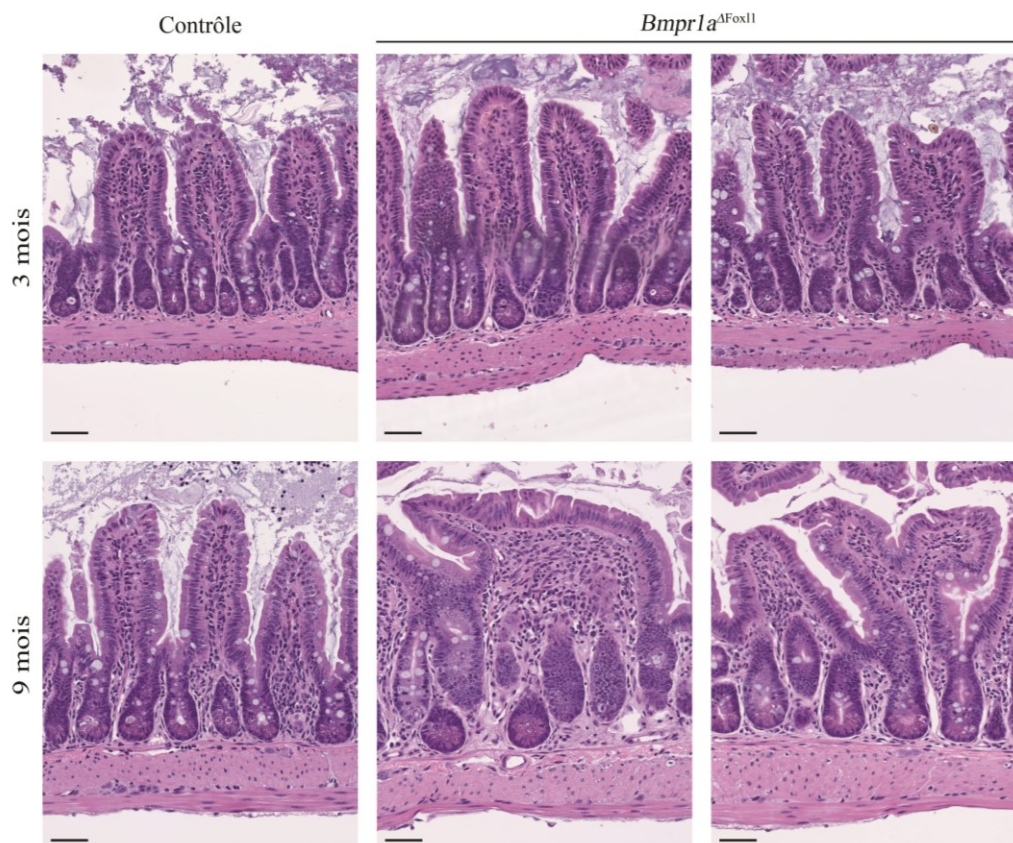


Figure 11. La perte de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺ entraîne une modification architecturale de l'iléon des souris dès 3 mois.

Coloration Hématoxyline et Éosine (H&E) des iléons des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 3 et 9 mois. Barre d'échelle = 50 μ m.

3.2 Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} présentent une modification de l'homéostasie cryptale

La fission cryptale est un phénomène permettant de maintenir l'homéostasie entre le nombre de cellules souches et de cellules de Paneth. En effet, les cellules de Paneth doivent être en contact direct avec les cellules souches afin de leur faire parvenir des ligands et petites molécules tels que le lactate (Roper et Yilmaz, 2017) et WNT3 (Farin et al., 2016). Le nombre de cryptes en fission par rapport au nombre de cryptes totales est de 7.4% chez les souris contrôles contre 19.5% chez les souris mutantes âgées de 9 mois (Figure 12). Cette augmentation de 12% ($p < 0.05$) suggère une possible modification dans le ratio de cellules souches pour le nombre de cellules de Paneth, suggérant ainsi un défaut dans l'homéostasie de ce système finement régulé.

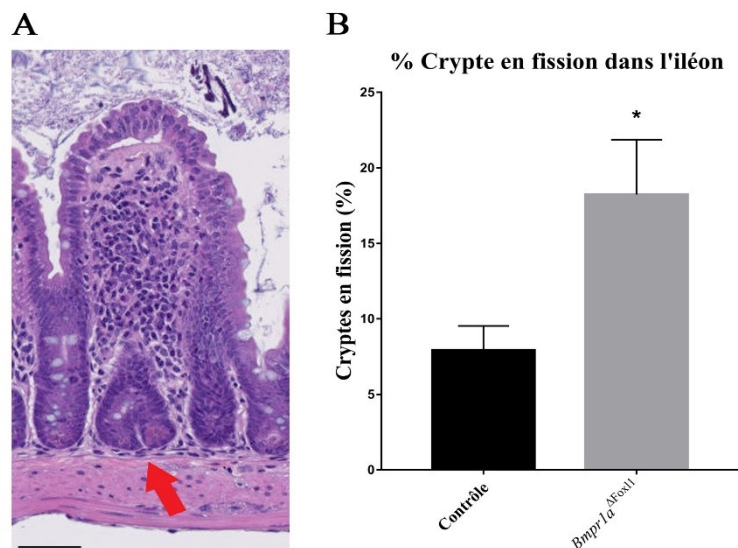


Figure 12. Augmentation de la fission cryptale dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}
 A. Coupe d'iléon de souris de 9 mois, coloration H&E. La flèche rouge indique un exemple d'une crypte en fission. Barre d'échelle=50μm. B. Quantification du nombre de fission cryptale dans l'iléon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 9 mois. Signification statistique déterminée par le Test Mann-Whitney, * p<0.05, N=4.

3.3 La voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ entraîne l'expression de facteurs de la niche mésenchymateuse des cellules souches intestinales

La niche mésenchymateuse et les cellules responsables de sa formation est un domaine de recherche en expansion actuellement. Les cellules FOXL1⁺ ont été identifiées comme produisant certains de ces facteurs comme WNT2B, WNT5A, RSPO3, GREML 1 et 2 (Aoki et al., 2016). De manière générale, les facteurs de la niche mésenchymateuse sont des inhibiteurs de la voie des BMPs (Noggin, Gremlin 1), des potentialisateurs de la voie des Wnts (R-spondin 1 et 3) et des facteurs de la voie des Wnts (WNT2B, WNT5A). L'expression de ces facteurs a donc été mesurée par PCR quantitatif (qPCR) sur des extraits d'iléon totaux. Tout d'abord, au niveau de la voie des Wnts, l'expression du facteur *Wnt2b* est augmenté de 51% de façon tendancielle (p<0.1) dans les iléons des souris mutantes par rapport au contrôle, l'expression de *Wnt5a* ne varie pas significativement. L'augmentation d'expression de *Wnt2b* n'est pas significative puisque la valeur p n'est pas inférieure à 0.05. Ce résultat suggère une variation, qui devra cependant être confirmée en augmentant le

nombre d'échantillons. Les gènes codant pour les potentialisateurs de la voie Wnt *Rspo1* et *Rspo3* ne sont pas modulés dans les souris mutantes par rapport aux contrôles. Chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} l'expression de *Gremlin1* ne varie pas, mais celle de *Noggin* est diminuée de 86% (p<0.01).

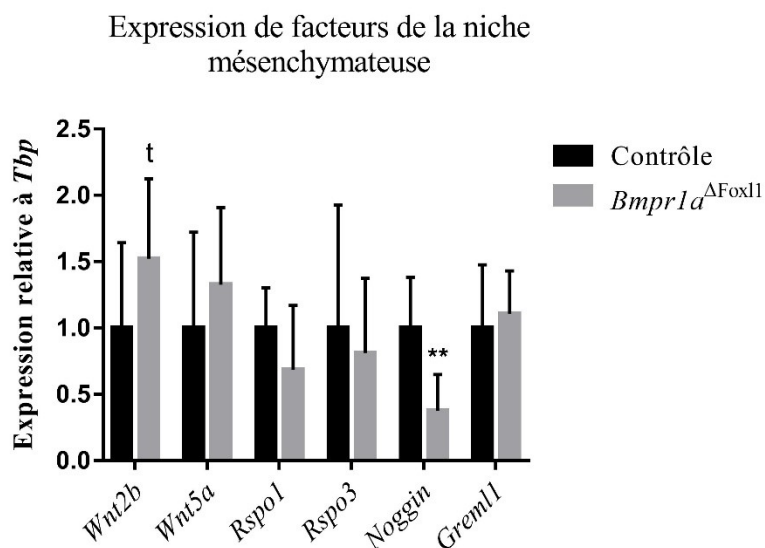


Figure 13. Analyse de l'expression des facteurs de la niche mésenchymateuse. Quantification de l'expression par qPCR de *Wnt2b*, *Wnt5a*, *Rspo1*, *Rspo3*, *Noggin* et *Greml1* dans les iléons des souris âgées de 9 mois et plus. Analyse statistique Mann Whitney, ** p<0.01, t p<0.1. Contrôles N=7, Mutants N=8.

3.4 La voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ régule la production des facteurs de la niche épithéliale

La niche épithéliale est principalement constituée par les cellules de Paneth qui produisent WNT3, un facteur de la voie Wnt entraînant l'activation de la voie dans les cellules souches avoisinantes. Par qPCR il a été possible de mesurer l'expression de *Wnt3* dans les cryptes des souris âgées de 9 mois. L'expression de *Wnt3* est diminuée de 65% (p<0.01) dans les cryptes des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} (Figure 14). Cette drastique variation montre que la niche épithéliale est très affectée par la perte de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺. Non seulement le mésenchyme sous-jacent contribue à la formation de la niche, mais il régule directement la niche épithéliale.

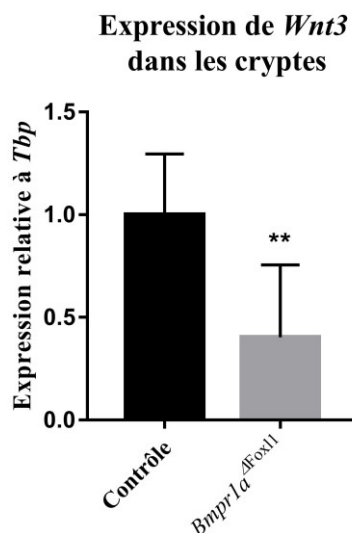


Figure 14. Perte d'expression de *Wnt3* suite à la délétion de la signalisation des BMPs dans les cellules FOXL1⁺.

Quantification de l'expression par qPCR de *Wnt3* dans les cryptes du jéjunum des souris âgées de 9 mois. Test statistique Mann-Whitney, ** $p < 0.01$, N=8.

3.5 Les cellules souches sont affectées par la perte de la signalisation BMP dans les cellules FOXL1⁺

Les cellules souches sont composés de deux groupes: les cellules actives et celles quiescentes. Par analyse qPCR sur des extraits de cryptes de jéjunum, les facteurs des cellules souches ont été quantifiés et analysés. Cette analyse a permis de mesurer une perte de 46% ($p < 0.01$) de l'expression de *Lgr5*, marqueur principal des cellules souches actives (Figure 15, A). Une tendance à la baisse, cependant non significative est observée pour plusieurs autres marqueurs tels que *Olfm4*, *Lrig1*, *mTert* et *ChgA*. Grâce à l'analyse du séquençage d'ARN il est possible de réaliser un graphique d'enrichissement permettant de mesurer la variation d'expression pour un groupe de gènes en particulier. Une liste de gènes marquant des cellules souches intestinales a donc été utilisée et les résultats de cette analyse ont permis de montrer une diminution statistiquement significative des marqueurs de cellules souches (Figure 15, B et C). Ceux les plus diminués sont *ChgA*, *Dll1*, *Nkx2.2* et *Msi1* (classe des cellules progénitrices) ainsi que *Tnfrsf19*, *Smoc2* et *Lgr5* (classe des cellules actives) (Figure 15, C). La classification des marqueurs des cellules souches a été publiée dans la revue écrite par Kim et collaborateurs (Kim et al, 2017). L'immunofluorescence contre OLFM4 (Figure

15, D) a permis de localiser les cellules souches intestinales, de montrer leur présence chez les contrôles comme chez les souris mutantes. Confirmé par immunobuvardage de type Western (Figure 15, E), les expressions génique d'*Olfm4* et protéique d'OLFM4 ne sont pas modulées significativement chez les souris mutantes. En revanche, l'immunofluorescence contre SOX9 a permis de confirmer la diminution d'expression mesurée en qPCR. Il est possible d'observer une baisse du marquage de SOX9 dans les cryptes des souris mutantes par rapport aux souris contrôles. (Figure 15, F)

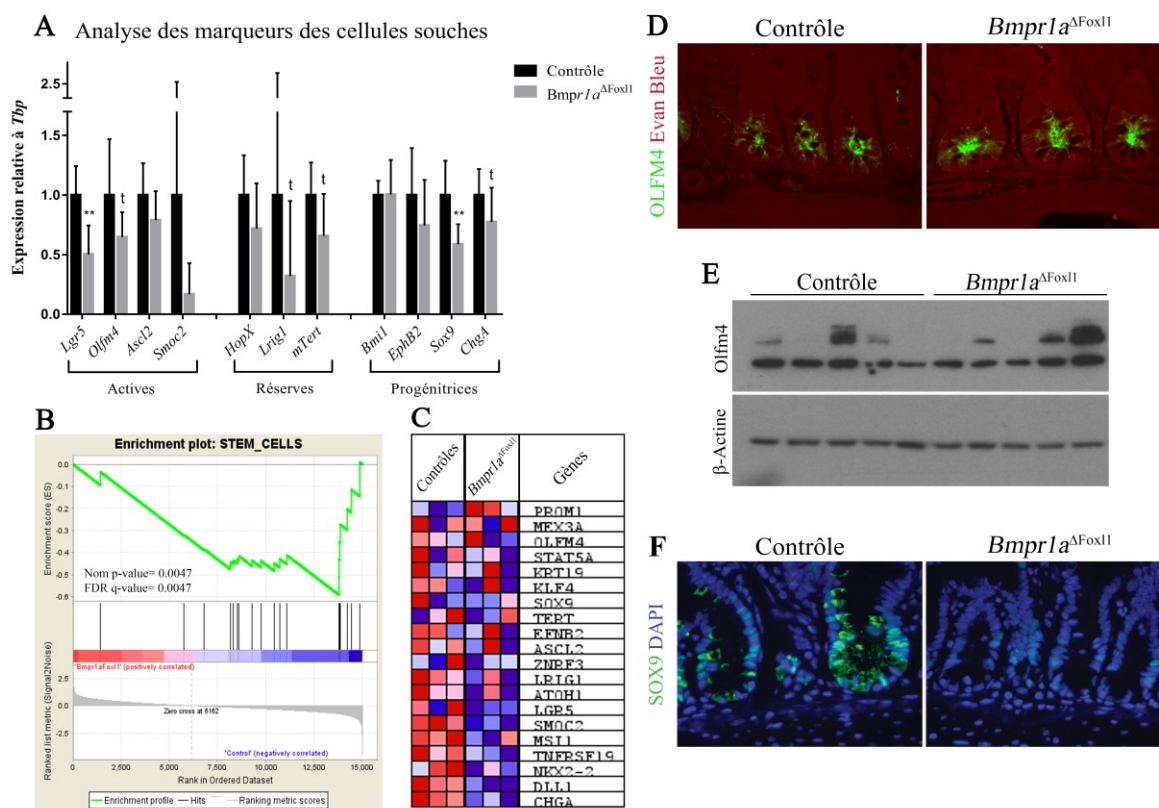


Figure 15. Caractérisation des cellules souches intestinales des souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1}*
 A. Analyse de l'expression des gènes caractéristiques des cellules souches intestinales actives, quiescentes et ayant des marqueurs de cellules progénitrices par qPCR sur des extraits de cryptes de jéjunum de souris âgées de 9 mois. B. Graphique d'enrichissement de gènes marqueurs de cellules souches intestinales issus de l'analyse par GSEA des résultats de séquençage de l'ARN des iléons de souris âgées de 9 mois. Résultats statistiques de l'analyse GSEA: FDR q-Value=0.0047, Nominal p-value=0.0047. C. Carte de chaleur des scores d'enrichissement pour chaque gène analysé en B. La couleur rouge correspond à une hausse d'expression chez les souris mutantes par rapport aux contrôles. Au contraire, la couleur bleue correspond à une baisse d'expression du gène chez les souris mutantes par rapport aux contrôles. D. Immunofluorescence contre OLFM4 dans les iléons des souris

âgées de 9 mois (grossissements 20X et 40X). E. Immunobuvardage de type Western contre OLFM4 dans cryptes du jéjunum de souris âgées de 9 mois et plus. F. Immunofluorescence contre SOX9 dans l'iléon des souris âgées de 9 mois. Grossissement 40x. Tests statistiques Mann-Whitney, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ et t $p < 0.1$.

3.6 La délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ entraîne une suractivation de la voie Wnt- β -caténine

La voie Wnt- β -caténine est très importante pour le maintien de l'état prolifératif des cellules cryptales. La β -caténine est l'effecteur de la voie Wnt canonique, elle transloque au noyau suite à l'activation par liaison d'un ligand au récepteur. Il est donc possible d'évaluer l'activation de la voie par localisation de la β -caténine au niveau du noyau ou en marquant les cellules prolifératives, le tout par marquage de type immunofluorescence ou immunohistochimie. Par immunobuvardage de type Western, il est possible de détecter la β -caténine non-phosphorylée i.e. sa forme active. Au niveau de l'ARN, la β -caténine agissant comme facteur de transcription lors de son association avec TCF4/LEF1, il est possible d'analyser les niveaux d'expression de gènes cibles (*cMyc*, *Axine2*) pour analyser l'état d'activation de la voie. En utilisant les données du séquençage d'ARN, il est possible de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus par Fevr et collaborateurs (Fevr et al, 2007). En effet, ils ont réalisé le séquençage de l'ARN de l'intestin de souris ayant une délétion de la β -caténine de manière inductible. Ces résultats permettent de découvrir les cibles directes et indirectes de la β -caténine chez la souris.

Tout d'abord dans notre modèle, l'augmentation de l'activité de la voie a été déterminée par immunobuvardage de type Western contre les formes totale et active de la β -caténine (Figure 16, A). L'anticorps reconnaissant la β -caténine active est spécifique à la forme non-phosphorylée de la β -caténine alors que l'anticorps utilisé pour identifier la β -caténine totale reconnaît toutes les formes indépendamment de la phosphorylation. En comparant les scores de densitométrie avec ceux de la protéine de référence, l'actine, il a été possible de quantifier une augmentation significative de 1.88x ($p < 0.01$) de la β -caténine active chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1} par rapport aux contrôles (Figure 16, B). La localisation nucléaire de la β -caténine active a été confirmée par immunohistochimie sur les coupes d'iléon de souris âgées de 9 mois. Une augmentation d'une cellule ($p < 0.01$) ayant un noyau marqué par la β -caténine par crypte a été mesurée, cette faible augmentation est toutefois statistiquement

significative (Figure 16, C). Cette augmentation est très faible par rapport à l'augmentation de β -caténine active mesurée en immunobuvardage.

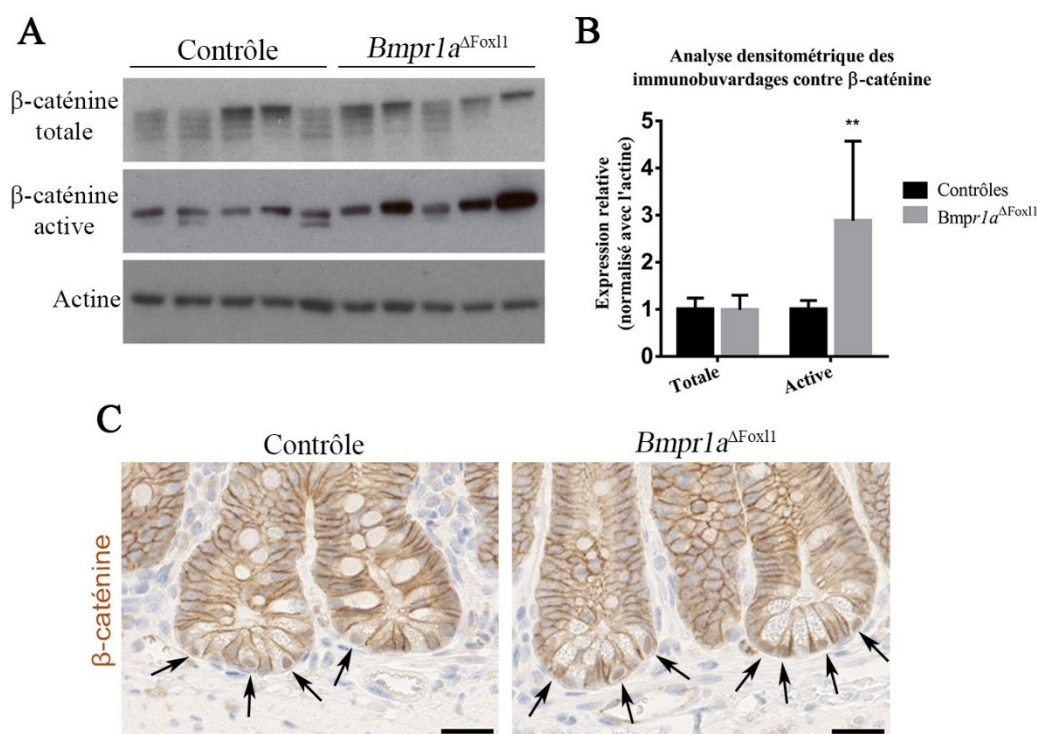


Figure 16. Augmentation de la β -caténine nucléaire chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}
 A. Immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques de cryptes du jéjunum de souris âgées de 9 mois et plus contre la β -caténine totale (panneau supérieur), la β -caténine active (panneau central) et l'actine comme protéine de référence (panneau inférieur). B. Quantification des résultats de A.: analyse densitométrique par rapport à l'actine. Test statistique Mann-Whitney, ** $p < 0.01$, $N = 5$. C. Immunohistochimie sur les iléons des souris âgées de 9 mois. Les flèches localisent les noyaux positifs pour la β -caténine nucléaire. La quantification par décompte du nombre de noyaux positifs par crypte a montré une augmentation moyenne d'un noyau positif par crypte dans les iléons des souris mutantes par rapport au contrôle (test statistique Mann-Whitney, ** $p < 0.01$, $N = 5$)

Au niveau transcriptionnel, la quantité d'ARNm du gène *Ctnnb1* codant pour la β -caténine a été mesurée par qPCR (Figure 17, A). Aucune modification n'a été observée, ce qui est en accord avec la quantité de β -caténine totale observée entre les souris mutantes et contrôles (Figure 16 A et B). L'analyse du séquençage d'ARN a permis de mettre en évidence une augmentation des cibles transcrites par la β -caténine et une diminution de celles réprimées par la β -caténine. En effet, deux listes de gènes ont été rendues disponibles dans la base de données de GSEA après la publication de Fevr et collaborateurs (Fevr et al, 2007). Dans cet

article sont listés les gènes transcrits (Figure 17, B) et réprimés (Figure 17, C) par β -caténine. Les résultats de la Figure 17 B montrent une augmentation de l'expression des cibles activées par β -caténine, et la Figure 17 C montre une diminution de l'expression des cibles réprimées par la β -caténine. Ces évidences confirment la suractivation de la voie Wnt- β -caténine dans les intestins des souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} âgées de 9 mois et plus.

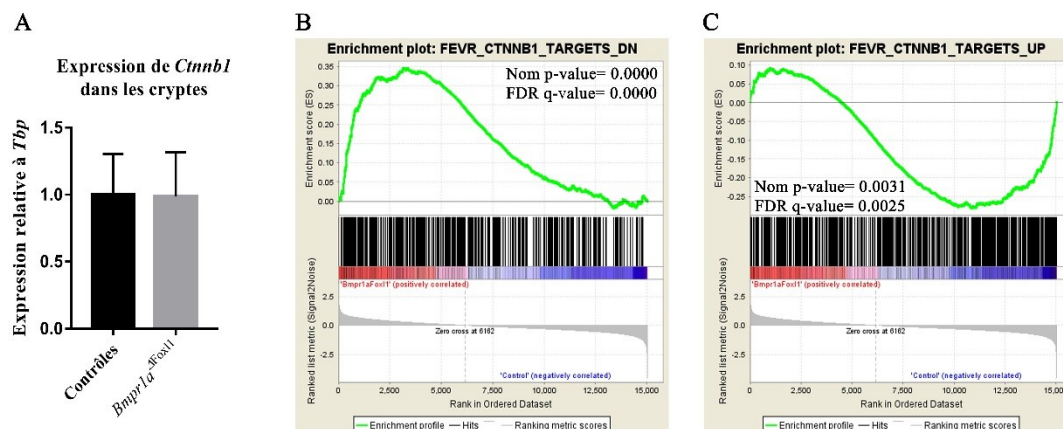


Figure 17. Activation des cibles de la voie Wnt- β -caténine dans les intestins des souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11}.

A. Analyse qPCR de l'expression de *Ctnnb1* dans les extraits de cryptes de jéjunum de souris âgées de 9 mois et plus. Test statistique Mann-Whitney, non significatif, N=8. B. Analyse GSEA de la liste de gènes diminués en absence de β -caténine. Valeur statistique: Nom p-value=0.0000, FRD q-Value=0.0000 C. Analyse de la liste de gènes augmentés en absence de β -caténine. Valeur statistique : Nom p-Value=0.0031 et FDR q-Value=0.0025.

Les gènes cibles de la voie Wnt- β -caténine ont été analysées par GSEA. En comparant les données du séquençage d'ARN avec la liste des cibles de MYC, il est possible d'observer que les cibles de MYC sont très fortement enrichies dans les iléons des souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} âgées de 9 mois (Figure 18). Cela signifie que les ARNm des gènes ciblés par MYC sont surexprimés dans les souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} par rapport aux souris contrôles. L'activité de MYC semble donc augmentée chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} en réponse à la suractivation de la voie Wnt- β -caténine.

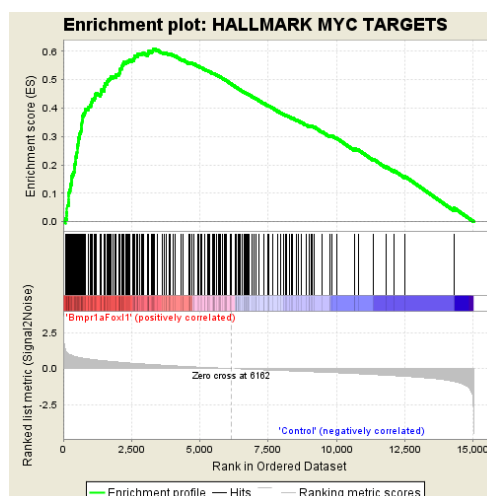


Figure 18. Surexpression des cibles transcriptionnelles de MYC dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

Analyse par GSEA de l'enrichissement des cibles de MYC dans les données obtenues en séquençage d'ARN. Test statistiques GSEA: Nom. p-Value et FDR q-Value = 0.000.

La voie Wnt contribue aussi à la régulation du cycle cellulaire, et plus particulièrement à sa progression, rendant cette voie un acteur principal dans la régulation de la prolifération intestinale (van de Wetering et al., 2002). Grâce aux résultats du séquençage d'ARN, il a été possible de comparer les résultats obtenus à une liste de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Une augmentation significative de ces transcrits a été observée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} (Figure 19, A). Afin de confirmer l'activation du cycle cellulaire suggérée par l'analyse des ARN, les cellules prolifératives présentes dans les iléons des souris âgées de 9 mois ont été localisées par immunofluorescence contre la protéine Ki67 (Figure 19, B). Ki67 est exprimée au noyau lors du cycle cellulaire à partir du milieu de la phase G1 jusqu'à la fin de la phase M. Dans l'iléon, le compartiment prolifératif de l'épithélium est restreint à la base de la crypte; correspondant à ce qui est observé dans l'image de la souris contrôle. En revanche, chez la souris mutante, des cellules prolifératives sont présentes à la sortie de la crypte, et plus loin en montant dans la structure villositaire. De plus, un plus grand nombre de cellules prolifératives est observé dans le compartiment mésenchymateux dans les tissus des souris mutantes par rapport aux contrôles. Des décomptes cellulaires sont à effectuer afin de quantifier ces résultats.

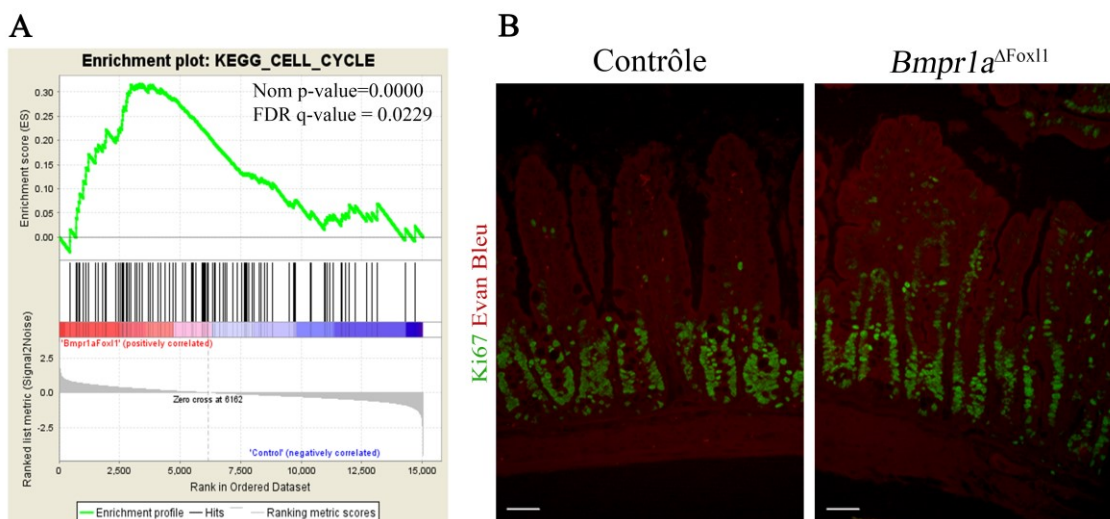


Figure 19. Suractivation du cycle cellulaire et hyper-prolifération chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

A. Graphique d'enrichissement permettant la comparaison des résultats obtenus par séquençage d'ARN des iléons des souris âgées de 9 mois à la liste des gènes codant pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire. B. Immunofluorescence contre Ki67 localisant les cellules en prolifération dans les iléons des souris âgées de 9 mois, barre d'échelle= 50µm. Il est possible d'observer un grand nombre de cellules prolifératives dans le mésenchyme de l'iléon de la souris mutante. De plus, il est possible de remarquer que la zone proliférative est agrandie dans les tissus de la souris mutante puisqu'elle s'étend au-delà de la crypte; le compartiment prolifératif est restreint à la crypte dans le tissu de la souris contrôlée.

3.7 Impact de la délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales

La différenciation des cellules progénitrices vers des cellules déterminées de la lignée sécrétrice ou absorbante est régulée par une balance d'expression entre ATOH1 et HES1, contrôlée par la voie Notch (Yang, 2001). L'expression d'*Atoh1* et d'*Hes1* a été mesurée par qPCR dans des extraits de cryptes de jéjunum de souris âgées de 9 mois; une diminution d'expression de 35% d'*Atoh1* ($p < 0.05$) et une diminution d'expression de 26% d'*Hes1* ($p < 0.05$) ont été mesurées dans les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} par rapport aux souris contrôles (Figure 20, A). L'analyse des résultats de séquençage d'ARN par GSEA a permis de montrer une diminution d'expression des cibles de la voie Notch. Cela permet donc d'expliquer la diminution d'expression d'HES1 mais cette diminution aurait dû se traduire par une

augmentation d'expression d'ATOH1 or c'est le contraire qui est observé. En effet, la perte d'*Hes1* devrait lever l'inhibition d'expression sur *Atoh1* (Zheng et al., 2011).

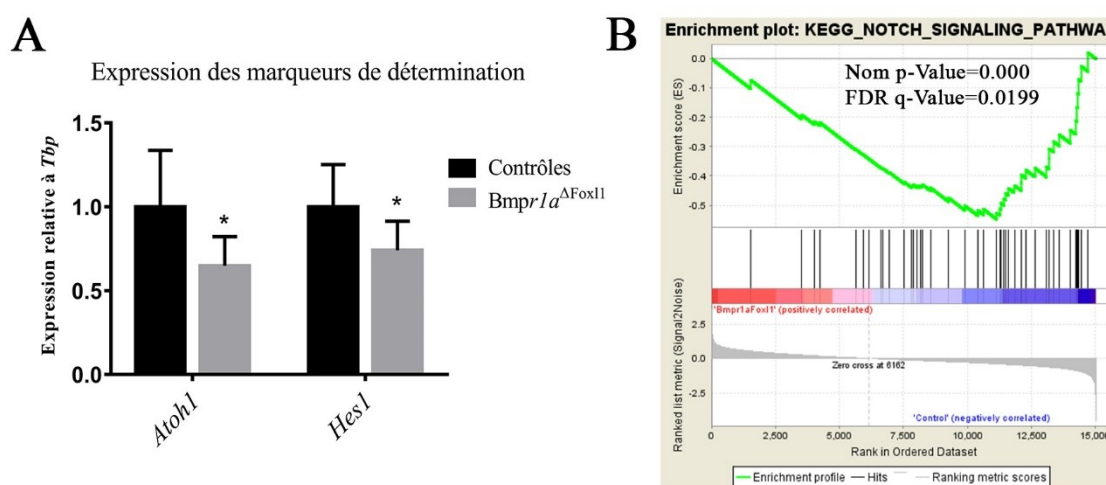


Figure 20. Diminution de la voie Notch chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

A. Analyse par qPCR de l'expression d'*Atoh1* et *Hes1* dans les cryptes du jéjunum des souris âgées de 9 mois. Test statistique Mann-Whitney, * $p < 0.05$, $N=8$. B. Analyse par GSEA de l'enrichissement des cibles de la voie Notch dans les données obtenues en séquençage d'ARN. Test statistiques GSEA: Nom. p-Value = 0.000 et FDR q-Value = 0.0199.

Les quatre principaux types de cellules différenciées présentes dans l'intestin sont les cellules absorbantes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. Des colorations et marquages sur les coupes d'iléons de souris de 9 mois ont été réalisés afin d'identifier tous ces différents types cellulaires et d'observer leurs statuts dans le cadre de la mutation de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺.

3.7.1 Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines ont été localisées par leur expression de la chromogranine A (CgA) dans l'iléon des souris âgées de 9 mois et plus (Figure 21). Aucune variation dans leur nombre a été mesurée montrant que la signalisation mésenchymateuse des BMPs ne joue pas de rôle dans la détermination des cellules entéroendocrines exprimant la CgA.

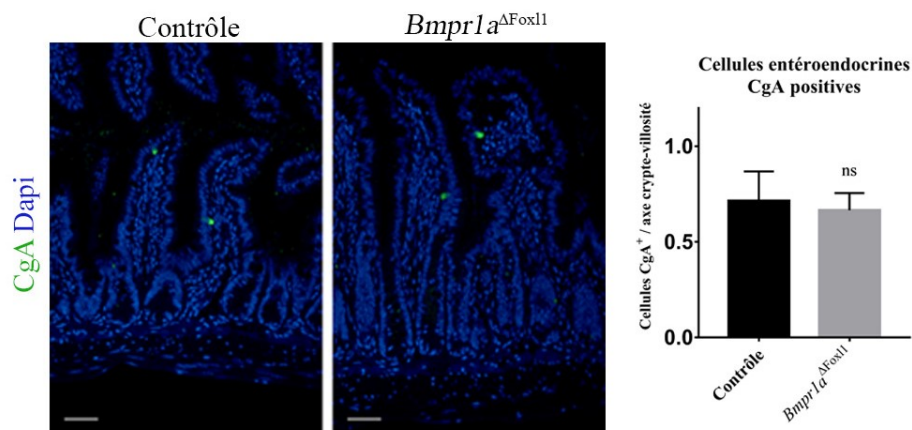


Figure 21. Analyse des cellules entéroendocrines exprimant la chromogranine A Immunofluorescence indirecte dirigée contre la Chromogranine A (CgA) dans l'iléon des souris âgées de 9 mois. Échelle= 50µm. Panneau de droite: décomptes du nombre de cellules CgA positives par axe crypte-villosité, test statistique Mann-Whitney, non-significatif (ns). N=6.

3.7.2 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes ont été marquées à l'Alcian Bleu, qui colore en bleu les mucines acides produites par les cellules caliciformes. Une faible augmentation du nombre de cellules caliciformes est observée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, puisque la moyenne est de 14 cellules par axe crypte-villosité contre 11 cellules par axe chez les souris contrôles ($p < 0.01$) (Figure 22). Cette faible différence montre tout de même que les cellules caliciformes sont affectées par la perte de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺. Il est aussi important de garder en tête que la délétion de la voie ne se fait pas dans la totalité des cellules Foxl1⁺ puisque la recombinaison des séquences loxP par la Cre ne se fait pas dans 100% des cellules FOXL1⁺.

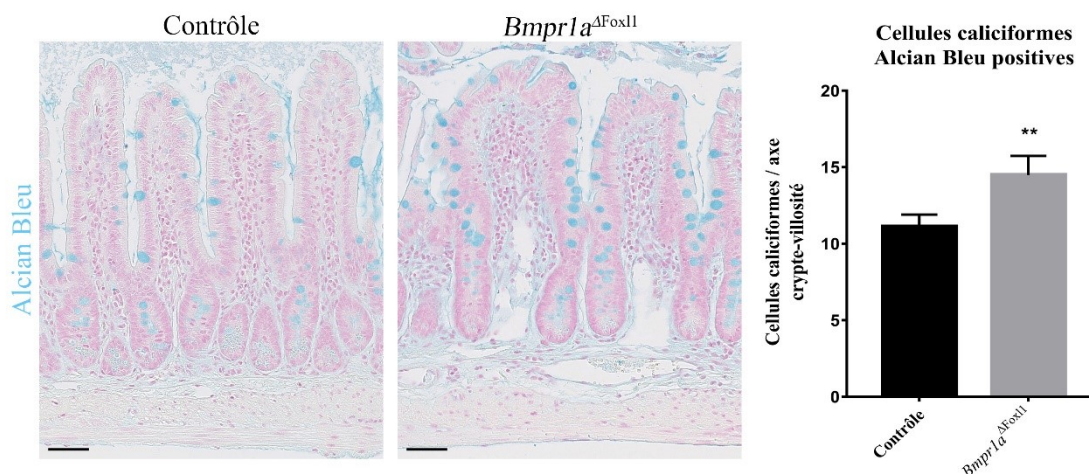


Figure 22. Augmentation du nombre de cellules caliciformes chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}

Coloration à l'Alcian Bleu permettant de localiser les cellules caliciformes dans l'iléon des souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 9 mois. Décomptes des cellules caliciformes par axe crypte-villosité dans l'iléon des souris âgées de 9 mois. Test statistique Mann-Whitney, ** $p < 0.01$, $N=5$.

3.7.3 Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth ont été localisées par marquage contre le lysosyme, facteur antimicrobien produit par celles-ci. Comme il est possible d'observer sur la Figure 23, panneau supérieur, aucune modification dans l'expression du lysosyme n'est observable dans les iléons des souris âgées de 9 mois. La coloration à la Best's Carmine (Figure 23, panneau central) permet de visualiser les granules de sécrétion présents dans les cellules de Paneth. Ces granules permettent aux cellules de Paneth de sécréter tous les facteurs produits, dont le lysosyme mais aussi certains facteurs de la niche des cellules souches. La coloration a permis de suspecter une augmentation de la taille de ces granules, suspicion ensuite confirmée par microscopie électronique à transmission (TEM, figure 23, panneau inférieur). A la suite du calcul de l'aire des granules des cellules de Paneth, la comparaison de la distribution du nombre de granules par taille a montré une augmentation significative de 15% ($p < 0.05$) du nombre de grands granules ($>3\mu\text{m}^2$) chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles (Figure 24).

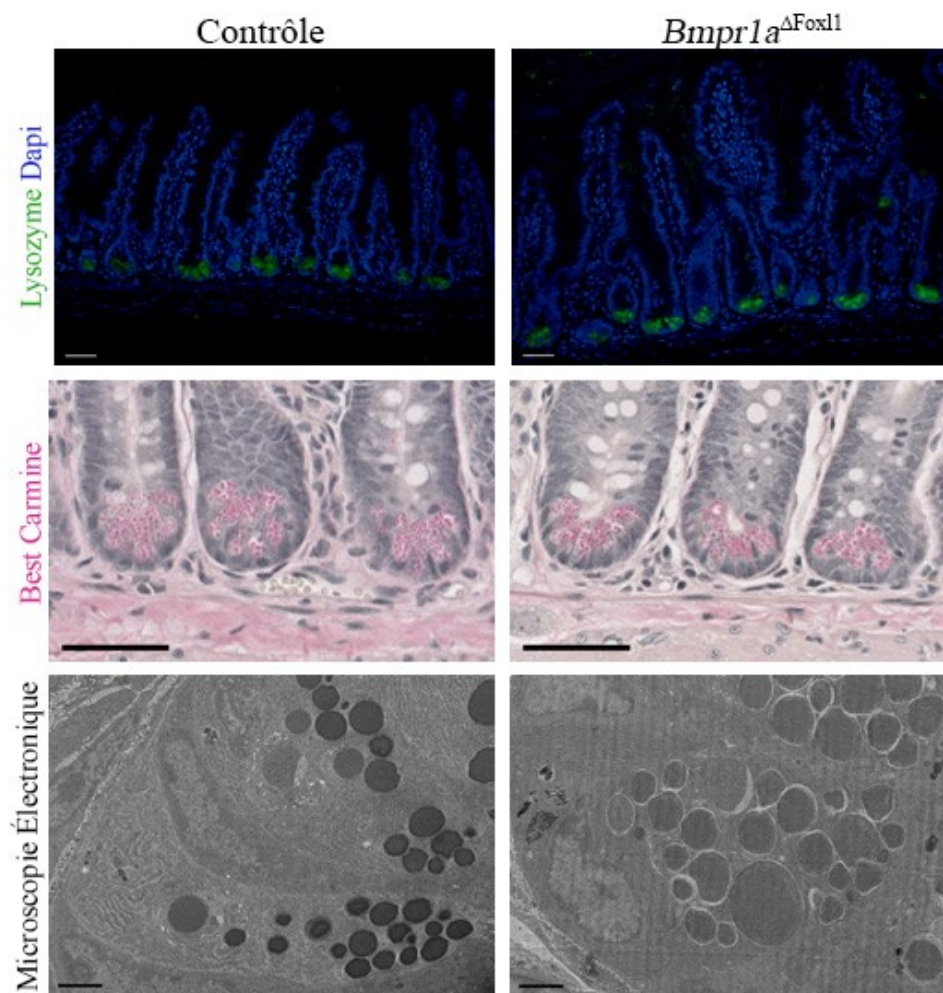


Figure 23. La mutation de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ affecte les cellules de Paneth.

Analyse des cellules de Paneth des iléons des souris âgées de 9 mois. Panneau supérieur: immunofluorescence indirecte contre le lysozyme (vert) avec contre coloration au DAPI (bleu), échelle= 50 μ m. Panneau central: coloration des granules des cellules de Paneth à la Best's Carmine, échelle= 50 μ m. Panneau inférieur: observation des cellules de Paneth au microscope électronique à transmission, échelle= 2 μ m.

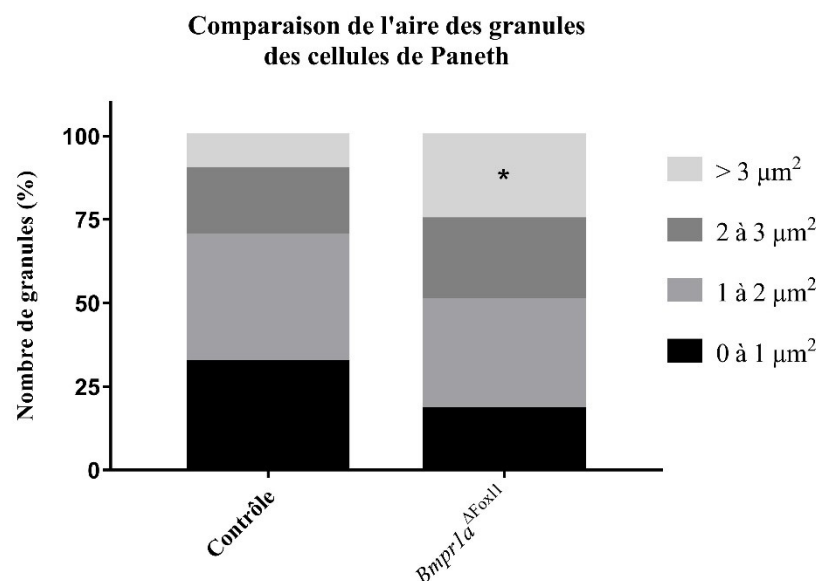


Figure 24. Augmentation du nombre de grands granules dans les cellules de Paneth chez les souris *Bmpr1a Δ Foxl1* Comparaison de l'aire des granules des cellules de Paneth à partir des images de microscopie électronique à transmission. Mesures d'aire réalisées à l'aide du logiciel ImageJ, analyse statistique réalisée avec GraphPad Prism, Student t-test, * $p < 0.05$, $N = 3$.

L'analyse par qPCR des cryptes isolées de jéjunum de souris a permis d'analyser les marqueurs propres aux cellules de Paneth (Figure 25). Correspondant à ce qui a été observé en immunofluorescence à la Figure 23, l'expression du gène codant pour le lysozyme ne varie pas entre les souris contrôles et mutantes. En revanche, tel que vu précédemment dans les sections 3.4 et 3.5, les expressions de *Wnt3* et *Sox9* sont très fortement diminuées. Cela indique que les cellules de Paneth présentes chez les souris mutantes ne remplissent pas leur rôle de production de ligand de WNT pour les cellules souches intestinales, et ne seraient peut-être pas en mesure d'agir comme cellule souche progénitrice en cas de dommage. Les rôles de WNT3 et SOX9 ont été décrits plus en détail dans l'introduction. Les Éphrines sont des protéines impliquées dans le positionnement des cellules de Paneth (Batlle et al., 2002). En effet, les cellules de Paneth sont les seules cellules différenciées résidant au fond de la crypte. Une fois leur détermination assez avancée, l'expression des Éphrines permet la migration des cellules de Paneth du milieu de la crypte vers le fond de celle-ci. L'expression d'*EphB1* et *EphB2* reste inchangée chez les souris mutantes.

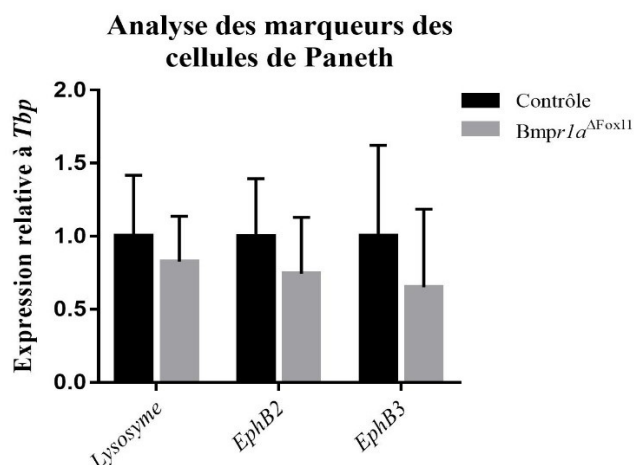


Figure 25. Analyse des marqueurs des cellules de Paneth

Analyse par qPCR de l'expression relative de gènes impliqués dans les cellules de Paneth: *Lysozyme*, *EphB2* et *EphB3* dans les cryptes du jéjunum de souris âgées de 9 mois.

3.7.4 Les cellules absorbantes

Les cellules absorbantes expriment la sucrase-isomaltase (SI) une fois leur maturation complétée de façon terminale. Cette enzyme permet la digestion des sucres nécessaire à leur absorption subséquente. En condition normale, une fois sorties de la crypte, les cellules sont différenciées et commencent à exprimer la SI. La Figure 26 montre une immunofluorescence contre la SI dans les iléons des souris âgées de 9 mois. Il est possible d'observer que, dans les souris contrôles, l'expression débute dès la sortie de la crypte tel qu'attendu. En revanche, chez les souris mutantes, il est possible d'observer la présence de SI à partir du dernier tiers de la crypte (image centrale) ou même à partir de la moitié de la crypte (image de droite). Cette expression précoce démontre la présence de cellules absorbantes différenciées de manière terminale dans la crypte. Ces résultats suggèrent donc que la maturation des cellules absorbantes pourrait être réalisée précocement dans l'iléon des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

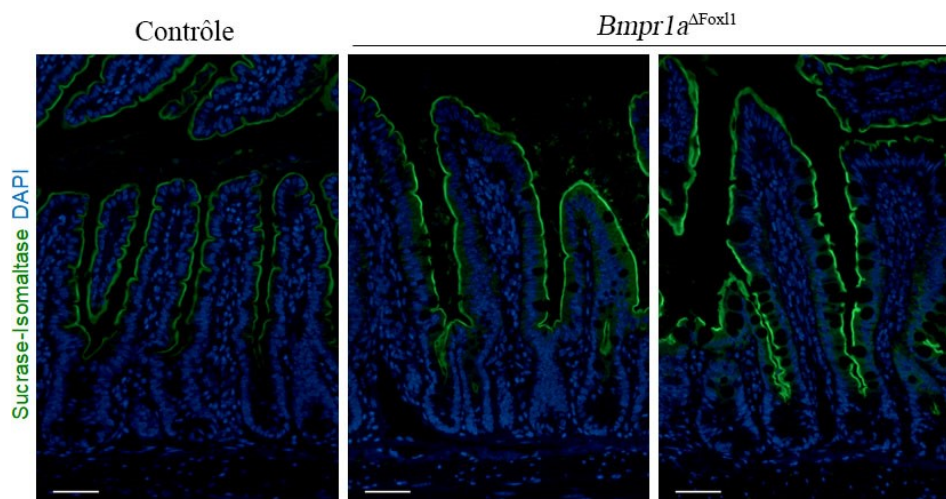


Figure 26. Expression précoce de la SI dans les iléons des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$. Immunofluorescence indirecte contre la SI dans les iléons des souris âgées de 9 mois. Barre d'échelle= 50 μ m.

3.8 Potentiel de régénération après irradiation

Afin d'évaluer la capacité de régénération du tube digestif de ces souris, les souris irradiées ont été pesées 2 fois par jour puis sacrifiées 4 jours après l'irradiation. Une cohorte de 12 souris a été réalisée, comprenant 3 mâles contrôles, 3 mâles $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$, et idem pour les femelles. La réponse à l'irradiation est variable selon le sexe, c'est pourquoi la cohorte a été planifiée de cette manière, et que les résultats de la Figure 27 ont été compartimentés par sexe. L'analyse des données de variation de poids après irradiation ne montre aucune différence entre les souris contrôles et $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$, quel que soit le sexe comparé (Figure 27, A et B). De même, les analyses des données de mesure de la taille du tube digestif (de l'estomac à la fin du côlon) et celles du poids de la rate des souris ne montrent aucune différence significative entre les deux groupes (Figure 27, C et D). Ces résultats démontrent que l'irradiation affecte les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$ de la même manière que les souris contrôles, d'un point de vue macroscopique.

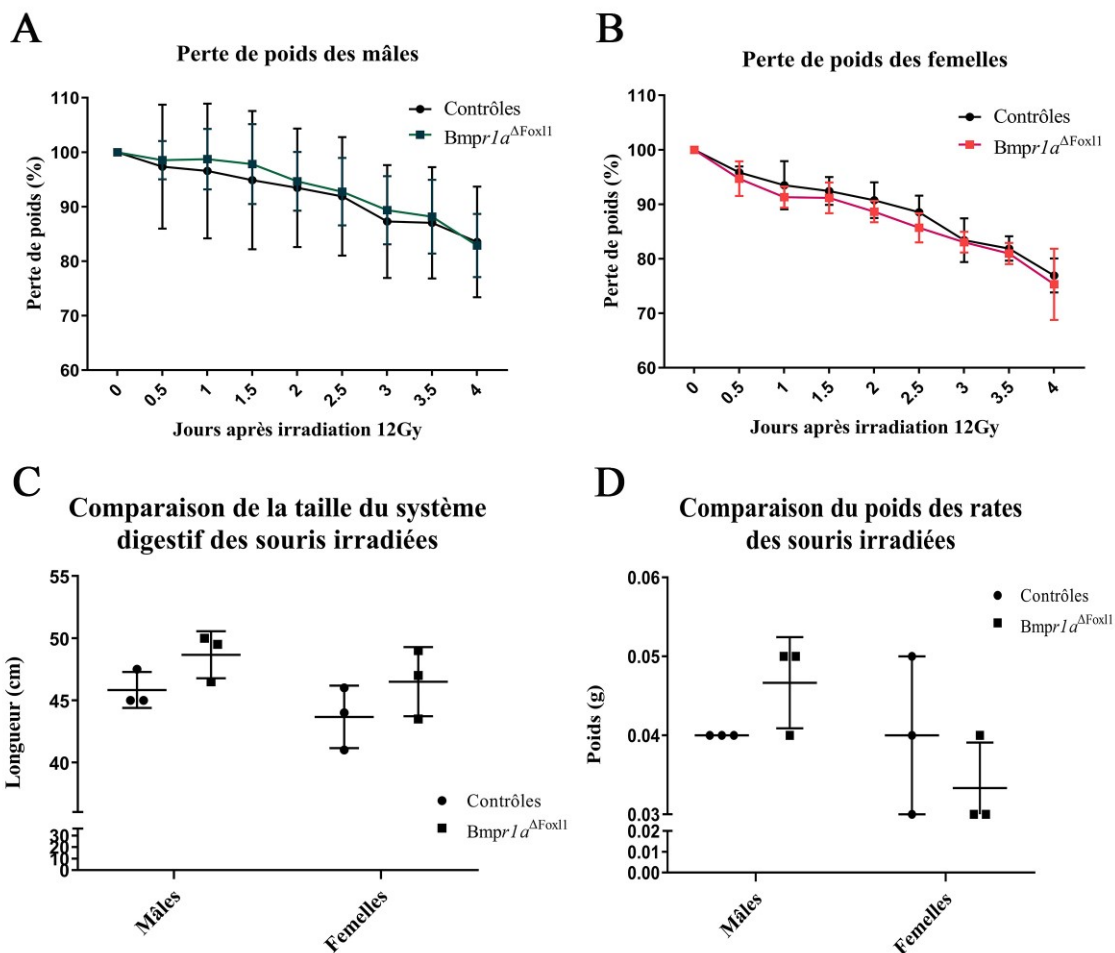


Figure 27. Analyse des mesures macroscopiques des souris irradiées

A. Analyse de la perte de poids des souris mâles après irradiation jusqu'au 4^{ème} jour B. Analyse de la perte de poids des souris femelles après irradiation. C. Mesure de la longueur du tube digestif (de l'estomac au côlon) des souris irradiées lors du sacrifice. D. Analyse du poids des rates des souris irradiées lors du sacrifice.

Au niveau architectural, les blocs d'iléons ont été coupés et les coupes ont été colorées avec la coloration H&E. La figure 28 montre des images représentatives de chaque groupe. Deux types de zones peuvent être observées: des zones en régénération (figure 28, gauche) et des zones très fortement atteintes (Figure 28, droite) dans lesquelles la structure en axe crypte-villosité est difficile à distinguer, la muqueuse est très fine, le tissu semble érodé. Dans les zones en régénération, les cryptes sont allongées et le mésenchyme est très présent.

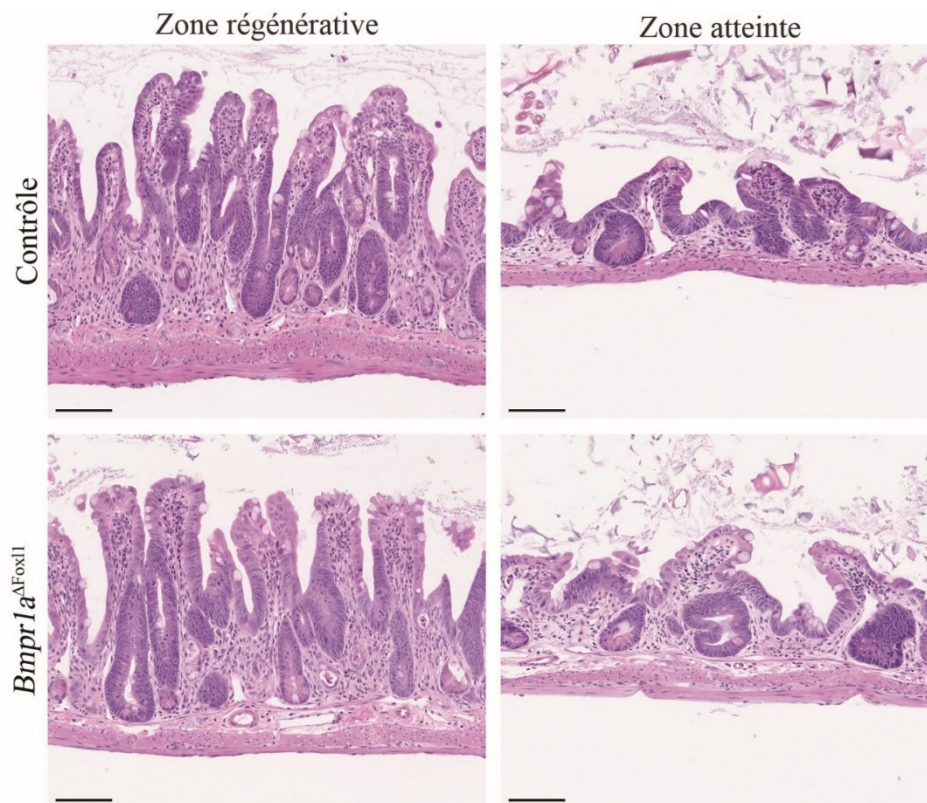


Figure 28. Comparaison de l'histologie des iléons des souris irradiées.

Coloration H&E des iléons des souris irradiées âgées de 3 mois, zone régénérative à gauche et zone très atteinte à droite. Barres d'échelle=100 μ m.

La prolifération des cellules est le reflet de la capacité d'un tissu à se régénérer. Dans les iléons des souris irradiées, une immunohistochimie contre BrdU a été réalisée. Le BrdU est un agent s'intercalant dans l'ADN des cellules qui se divisent, il marque donc les cellules lors de leur phase S. La Figure 29A montre des zones en régénération et atteintes représentatives pour chaque génotype, le nombre de zones prolifératives, c'est-à-dire d'un groupe de cellules marquées au BrdU ne varie pas entre les souris contrôles et *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} (Figure 29, B). En revanche, le nombre de cellules prolifératives par axe est augmenté de 1.32 fois dans les zones régénératives et de 1.72 fois dans les zones atteintes chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} par rapport aux souris contrôles. Les souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} présentent donc une prolifération accrue, signe d'une régénération augmentée. Cependant, le nombre de cellules BrdU n'a pas été mesuré chez les souris non-irradiées de 3 mois. Afin de comparer la prolifération après irradiation, il aurait été intéressant de connaître le statut avant irradiation. En effet, il est possible que les souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} présentent une augmentation du nombre

de cellules marquées au BrdU sans irradiation, rendant l'augmentation de prolifération non pas irradiation-dépendante mais BMP-dépendante.

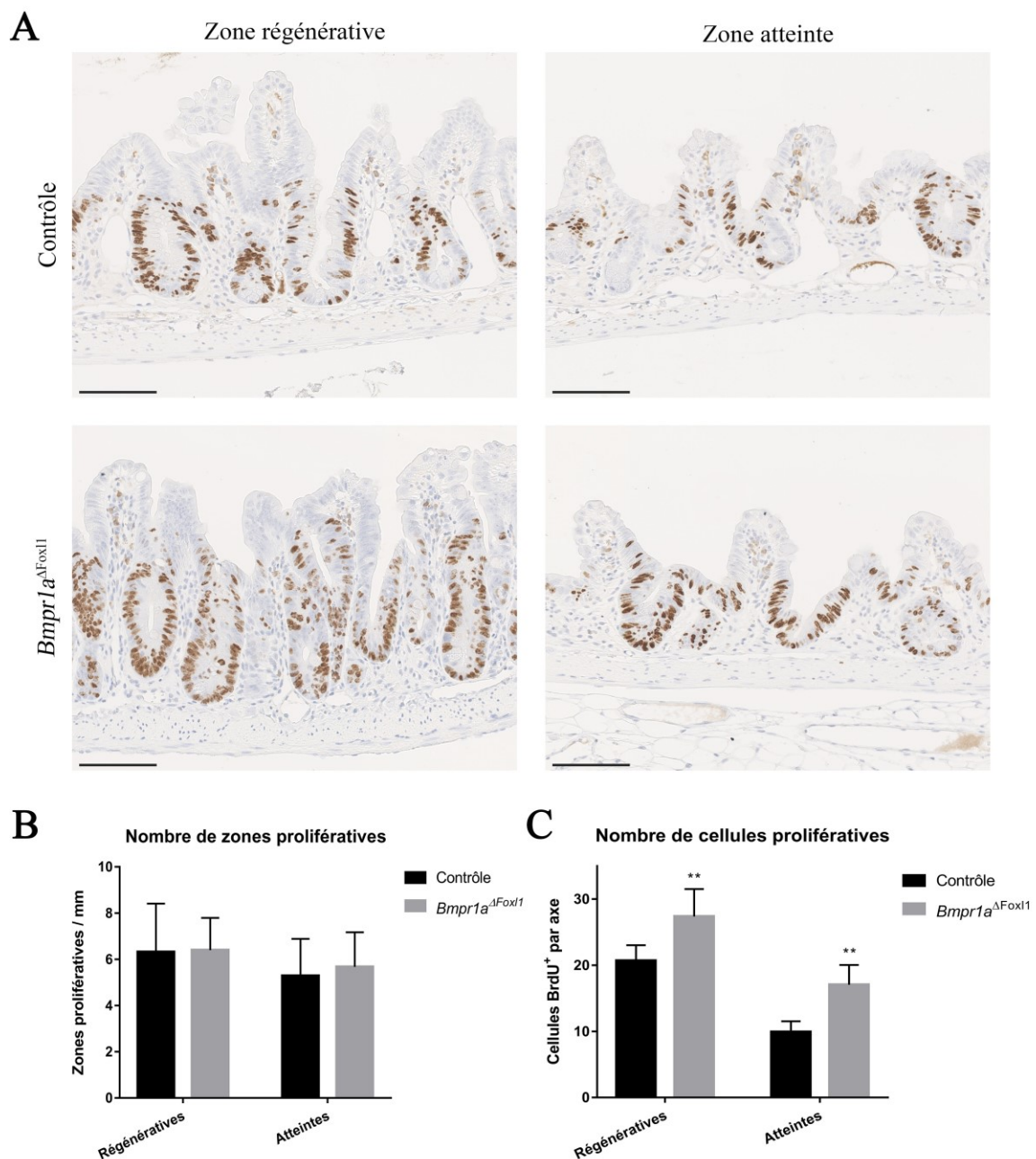


Figure 29. Augmentation des cellules prolifératives dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} irradiées.

A. Immunohistochimie contre BrdU, injecté 90 min avant le sacrifice des souris irradiées. Barre d'échelle=100µm. B. Décomptes du nombre de zones prolifératives par mm de tissu

dans les zones régénératives et atteintes. Test statistique Mann-Whitney, non-significatifs, N=6. C. Nombre de cellules prolifératives par axe crypte-villosité, dans les zones régénératives et atteintes. Test statistique Mann-Whitney, ** p<0.01, N=6.

Une coloration Alcian Bleu combinée avec la coloration Best's Carmine a été réalisée sur les coupes d'iléons de souris âgées de 3 mois non-irradiées, et sur les souris irradiées, dans les groupes contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Cette coloration double permet de marquer en bleu les mucines acides produites par les cellules caliciformes, et en rose les granules des cellules de Paneth. Chez les souris normales (non-irradiées), il est possible d'observer que les marquages ne co-localisent que très rarement, uniquement en cas de cellule progénitrice pas encore différenciée (Figure 30). Il est possible d'observer les granules des cellules de Paneth situées au fond de la crypte, et les mucines acides contenues dans les cellules caliciformes au niveau de la fin de la crypte et dans les villosités. En revanche, chez les souris irradiées, les cellules présentant le double-marquage sont très fréquentes, que ce soit chez les souris contrôles ou *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} (Figure 30, panneaux inférieurs). Cela montre que la détermination du progéniteur des cellules caliciformes/Paneth est bloquée, se traduisant par une augmentation du nombre de cellules exprimant des mucines et ayant des granules propres aux cellules de Paneth.

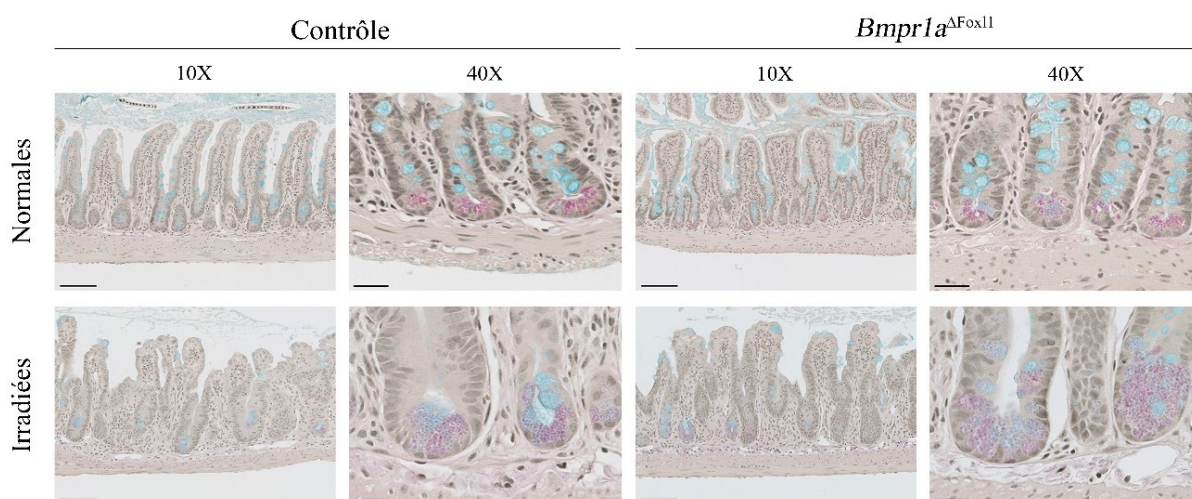


Figure 30. L'irradiation affecte la détermination des cellules caliciformes et Paneth. Coloration Best Carmine et Alcian Bleu des souris de 3 mois en condition normale (haut) et irradiée (bas). 10X: barre = 100μm, 40X: barre = 25μm.

Le risque de développer de la fibrose est très important après irradiation. Le collagène produit se structure en fibres et cela contribue à l'augmentation de la rigidité matricielle du tissu. La coloration Trichrome de Masson permet de colorer en bleu foncé les fibres de collagène et en bleu pâle le collagène non-structuré en fibres. La Figure 31 montre la coloration Trichrome de Masson dans les iléons des souris irradiées contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, dans les deux types de zones: en régénération et très affectées. Un marquage du collagène 1 a été réalisé par immunofluorescence sur ces tissus afin de localiser ce collagène spécifiquement puisque la coloration au Trichrome colore tous les types de collagènes. L'accumulation de collagène dans la *lamina propria* est similaire entre les souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Cependant, une accumulation de collagène 1 est observable tout en haut des villosités chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} uniquement. En effet, il est possible d'observer du marquage bleu accumulé sous l'épithélium en haut des villosités et l'immunofluorescence a permis de confirmer la présence de collagène de type 1. Un unique article identifie le collagène 1 comme empêchant l'apoptose des cellules GH₃ reposant sur celui-ci; leur donnant ainsi une résistance contre les rayons gamma (Azorin et al, 2012). Les cellules GH3 sont issues de cellules d'une tumeur de l'hypophyse de rat.

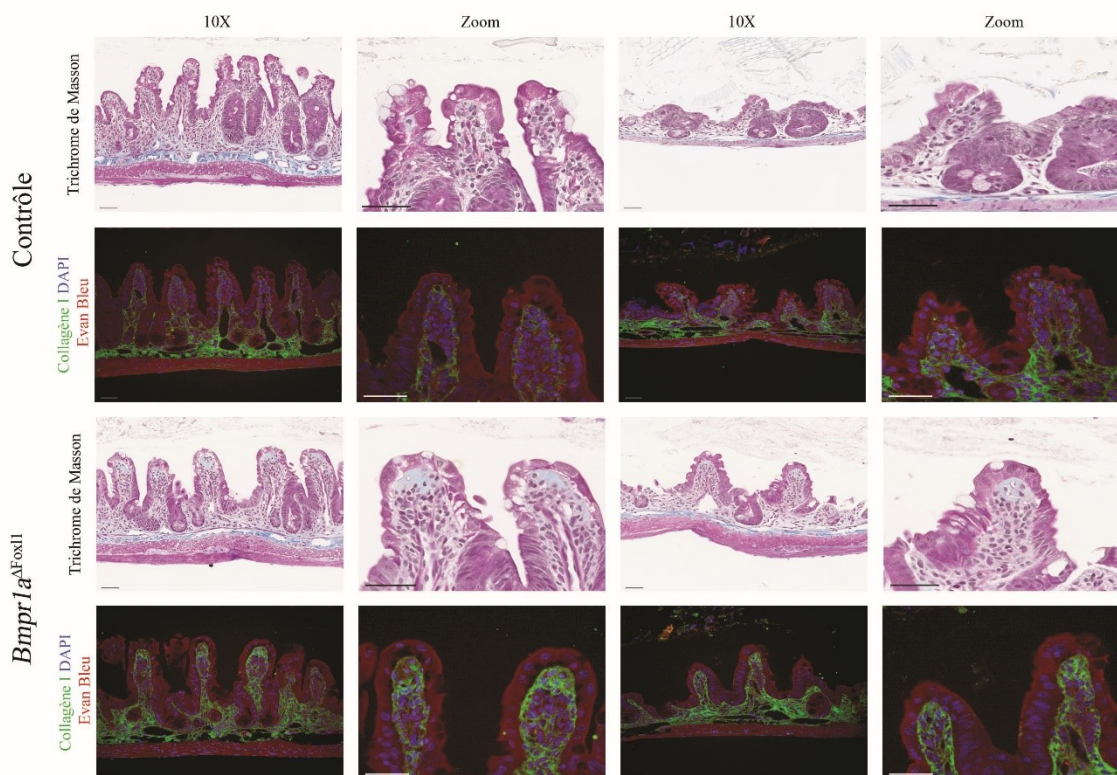


Figure 31. Accumulation de collagène 1 sub-épithélial dans le haut des villosités chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11}.

Coloration au Trichrome de Masson des iléons des souris irradiées de 3 mois, et immunofluorescence contre le collagène I (barres d'échelle = 50 μ m)

Pour évaluer si les conclusions d'Azarine et collaborateurs s'appliquent sur les tissus étudiés ici, les cellules apoptotiques ont été localisées par immunohistochimie contre la Caspase 3 clivée (CC3, Figure 32, A). La caspase 3 clivée est retrouvée chez les cellules mourant par apoptose-anoïkose. Les décomptes du nombre de cellules CC3⁺ par axe crypte-villosité n'ont montré aucune différence significative entre les souris contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFox11} (Figure 32, B). Cela indique donc que la présence de collagène au bout des villosités ne prévient pas l'apoptose des cellules dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} irradiées.

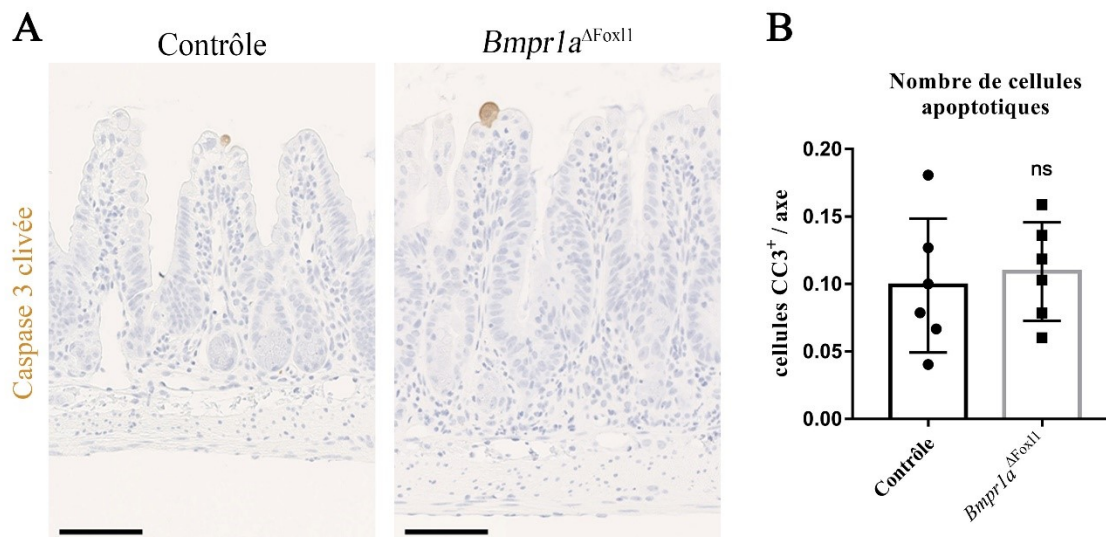


Figure 32. Analyse des cellules apoptotiques dans les iléons des souris irradiées
 A. Immunohistochimie contre la Caspase 3 clivée (CC3) sur les iléons des souris irradiées de 3 mois. Barre d'échelle= 100 μ m. B. Analyse des décomptes du nombre de cellules marquées à la Caspase 3 clivée (CC3⁺) par axe crypte-villosité de zones en régénération et atteintes, aucune différence significative (ns) n'est observée entre les groupes, test Mann Whitney, N=6.

La présence de collagène en haut des villosités est une caractéristique principale présente dans le *Collagenous Sprue*. Cette condition rare et sévère est une maladie de malabsorption intestinale chez l'humain. L'autre caractéristique histologique de la maladie est la présence d'une atrophie des villosités (Zhao and Johnson, 2011). Le nombre de lymphocytes T intra-épithéliaux peut aussi varier, indiquant une inflammation importante du tissu. Cette mesure est aussi réalisée lors du diagnostic de la maladie céliaque, une autre maladie entraînant une malabsorption intestinale. Les lymphocytes T CD3⁺ ont donc été marqués par immunohistochimie, les décomptes du nombre de lymphocytes ayant pénétré dans l'épithélium ne montrent aucune différence entre les souris irradiées contrôles et *Bmpr1a*^{ΔFox11} (Figure 33, A et B).

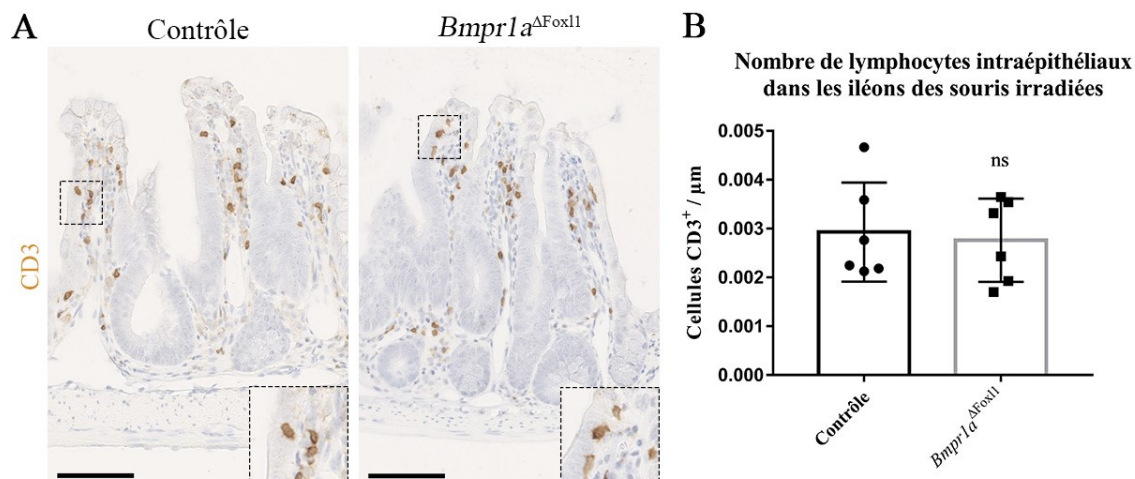


Figure 33. Analyse de l'infiltration des lymphocytes dans l'épithélium des iléons des souris irradiées.

A. Immunohistochimie contre CD3 marqueur des lymphocytes T dans les coupes d'iléons des souris irradiées. Barre d'échelle = 100μm. B. Mesure du nombre de lymphocytes CD3⁺ infiltrés dans l'épithélium par μm de tissu; aucune différence significative (ns) n'est observable entre les groupes par le test Mann-Whitney, N=6.

3.9 Implication de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ dans l'initiation du cancer colorectal

Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ont été croisées avec les souris *Apc*^{Min/+} afin d'obtenir des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1};*Apc*^{Min/+} (doubles mutantes). Les souris contrôles ont aussi été analysées: les souris contrôles (non-mutées), *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Apc*^{Min/+}. Les souris ont été analysées à 3 mois puisqu'à cet âge, les souris double-mutantes atteignaient souvent un point limite de l'éthique animale: elles étaient faibles, maigres, le dos courbé, et pouvaient avoir des saignements rectaux voir même des prolapsus. Ces observations ont été analysées par la mesure de leurs poids avant le sacrifice (Figure 34, A). Aucune différence de poids n'est observable chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et *Apc*^{Min/+} par rapport aux souris contrôles alors qu'une diminution du poids des souris double-mutantes est observée par rapport à tous les groupes contrôles (p<0.05). Les souris double-mutantes pèsent, en moyenne, 1.1g de moins que les souris contrôles, 1.7g de moins que les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et 2g de moins que les souris *Apc*^{Min/+}. La Figure 34 B représente la mesure du poids des rates des souris lors du sacrifice à 3 mois. Cette mesure permet d'évaluer l'état d'inflammation de la souris puisque la rate est le lieu de production de nombreuses cellules du système immunitaire. L'augmentation du poids des

rates de la souris double-mutante par rapport aux autres est marquante, avec une augmentation de 0.16g par rapport à la souris contrôle, 0.14g par rapport aux souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11}$ et $Apc^{Min/+}$. Il est possible de remarquer aussi qu'une augmentation du poids de la rate est observée chez la souris $Apc^{Min/+}$ et $Bmpr1a^{\Delta Fox11}$ par rapport à la souris contrôle, suggérant la présence d'inflammation dans ces deux groupes, inflammation décuplée dans le cas de la souris double-mutante.

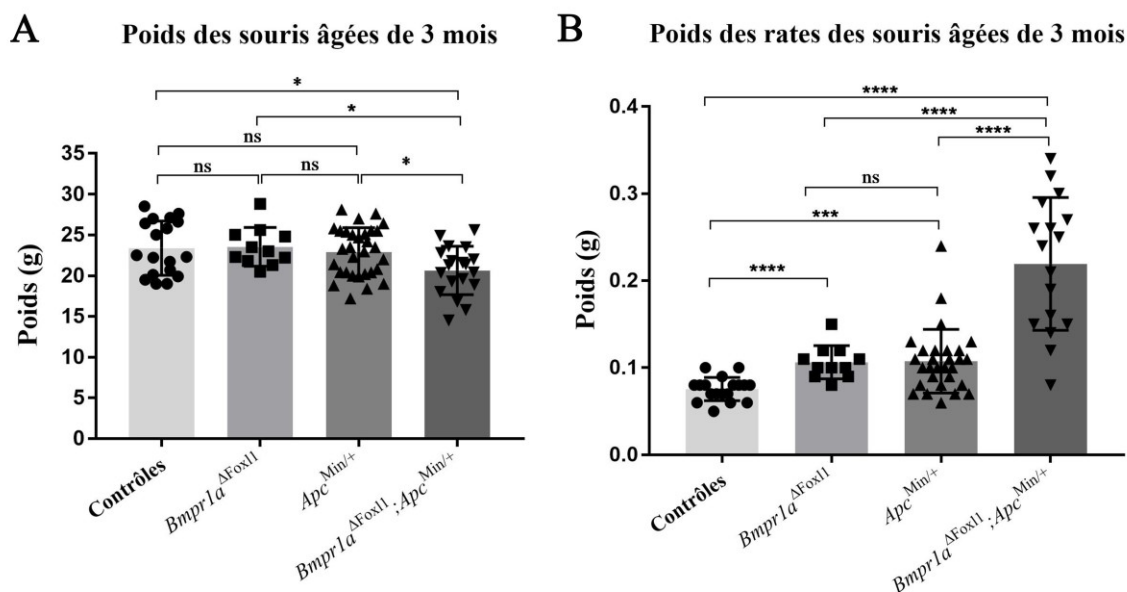


Figure 34. Analyse du poids des souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11}; Apc^{Min/+}$ à 3 mois ainsi que du poids des rates

A. Analyse du poids des souris contrôles, $Bmpr1a^{\Delta Fox11}$, $Apc^{Min/+}$ et $Bmpr1a^{\Delta Fox11}; Apc^{Min/+}$ à 3 mois. Analyse statistique test Mann-Whitney, * $p < 0.05$. B. Analyse du poids des rates des souris à 3 mois, après sacrifice. Analyse statistique test Mann-Whitney, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ et ns=non significatif.

Les décomptes du nombre de polype dans le tube digestif ont montré une augmentation de 3.8 fois du nombre de polypes chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11}; Apc^{Min/+}$ à 3 mois par rapport aux souris $Apc^{Min/+}$, la moyenne du nombre de polypes passant de 24 à 93. La perte d'un seul allèle de $Bmpr1a$ ne fait pas varier significativement le nombre de polypes par rapport à la souris $Apc^{Min/+}$ (Figure 35).

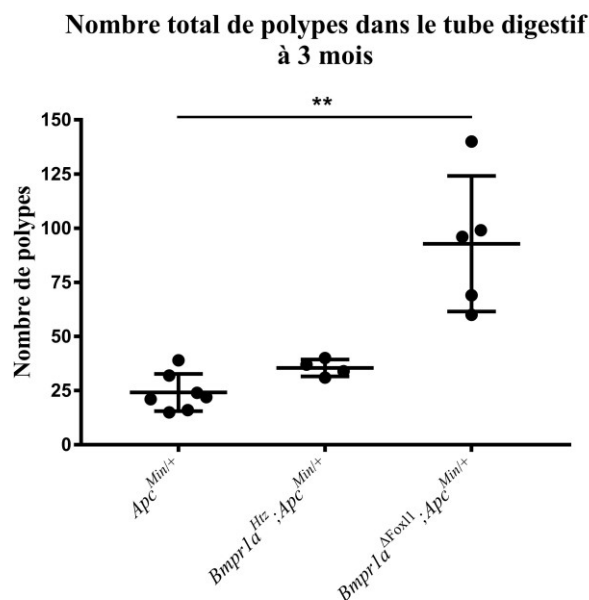


Figure 35. Augmentation du nombre de polypes dans le tube digestif chez les souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1};Apc^{Min/+}* à 3 mois

Décomptes du nombre de polypes totaux de l'estomac au rectum chez les souris âgées de 3 mois. Test statistique Mann Whitney, ** $p < 0.01$, $N=7$ *Apc^{Min/+}*, $N=4$ *Bmpr1a^{ΔHtz};Apc^{Min/+}*, $N=5$ *Bmpr1a^{ΔFoxl1};Apc^{Min/+}*.

Lors du sacrifice des souris à 3 mois, des photographies des colons entiers ont été prises afin de visualiser la charge et localisation tumorale. De plus, des décomptes du nombre de polypes dans le colon ont été réalisés afin de comparer quantitativement la charge tumorale. Les souris contrôle et *Bmpr1a^{ΔFoxl1}* ne présentent aucun polype à 3 mois (données non-montrées, voir (Allaire et al., 2016)). Les souris *Apc^{Min/+}* présentent 5.3 polypes coliques en moyenne, avec une moyenne de 1.57 polypes mesurant 2mm ou plus (Figure 36, A, B, C). Les souris *Apc^{Min/+}* présentent des polypes dans le colon moyen généralement, et dans certains cas dans le colon distal. Sur l'image de la Figure 36A, il est possible d'observer un polype pédiculé vascularisé dans le colon distal et deux autres polypes plus petits dans le colon moyen (flèches). Les souris *Bmpr1a^{ΔFoxl1};Apc^{Min/+}* présentent une forte augmentation du nombre de polypes dans le colon, comme il est possible d'observer sur la photographie à la Figure 36 A. Le nombre moyen de polypes coliques est de 15.8, avec une moyenne de 8.6 polypes mesurant plus de 2mm. Cela représente donc une augmentation du nombre de polypes coliques de 2.98 fois chez les souris double-mutantes, et une augmentation de 5.5 fois de la taille des polypes chez les souris double-mutantes par rapport aux *Apc^{Min/+}*. La distribution

du nombre de polype par taille montre que les souris $Apc^{Min/+}$ présentent 33% de polypes coliques de plus de 2mm, contre 51% pour les souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$. La Figure 36A et B présente aussi les résultats pour le souris n'ayant perdu qu'un allèle de $Bmpr1a$ appelée la souris $Bmpr1a^{Htz};Apc^{Min/+}$. Le nombre de polypes mesurés chez cette souris ne varie pas par rapport à la souris $Apc^{Min/+}$. Cette souris présente donc un phénotype similaire aux souris $Apc^{Min/+}$, elle n'a donc pas été analysée plus profondément au cours de ce mémoire.

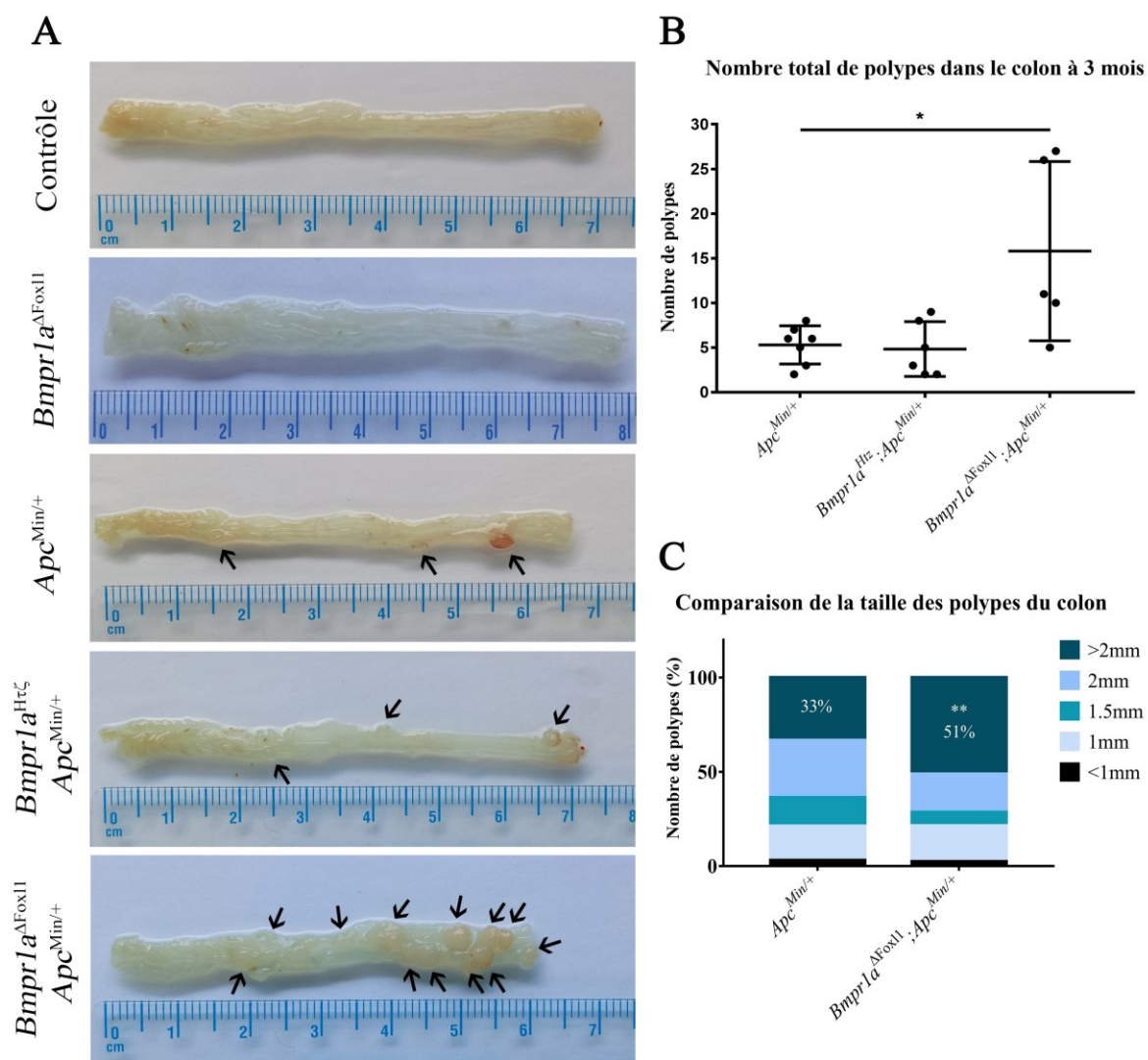


Figure 36. Analyse macroscopique des colons des souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$ âgées de 3 mois.

A. Images macroscopiques des colons immédiatement après sacrifice de la souris. Les flèches indiquent des polypes. B. Comparaison du nombre de polypes présentes dans les colons des

souris, test statistique Mann-Whitney, * p -value<0.05. C. Comparaison des tailles des polypes coliques des souris $Apc^{Min/+}$ et des souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$, test statistique Mann-Whitney, ** p <0.01.

Les coupes des colons des souris ont été analysées via coloration H&E afin d'observer l'architecture du tissu. La caractérisation histopathologique des polypes a été réalisée en collaboration avec P^{re} Marie-Odile Benoît-Biancamano de l'Université de Montréal. Cette analyse a été menée avec 3 souris pour chaque génotype. Les critères analysés sont la dilatation cryptale, l'hyperplasie et les adénomes (Figure 37). Les colons des souris contrôles ne présentent aucune caractéristique particulière, tel qu'attendu. Les souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11}$ montrent de l'hyperplasie de grade 2 en plus de la dilatation cryptale (images figure 37). Les souris $Apc^{Min/+}$ présentent de la dilatation cryptale et de l'hyperplasie de grade 1 de type focal, ainsi que des adénomes tubulaires et tubulovilleux de bas grade, dans le colon moyen et distal. Les souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$ présentent de la dilatation cryptale de grade 2, multifocale dans tout le colon. De l'hyperplasie cryptale est observable, de grade 1 et 2, dans le colon moyen surtout. Les polypes sont sessiles et pédiculés, de type tubulaire principalement. Ils sont localisés dans le colon distal principalement. Leur grade est bas, sauf dans un cas où le grade était haut, montrant de la progression dans l'agressivité tumorale. L'adénome de haut grade est caractérisé par une augmentation du nombre de cellules épithéliales, et une perte de définition de la limite entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent (Figure 37, B). Les polypes restent cependant des adénomes, ils n'évoluent pas en adénocarcinomes.

Les tissus sont toujours inclus dans le bloc de paraffine dans le même ordre, soit de bas en haut: du plus proximal au plus distal ce qui permet, à la Figure 38, d'observer la localisation des polypes dans le colon proximal, moyen ou distal. Dans l'image représentative des souris $Apc^{Min/+}$, le polype est situé dans le colon moyen, l'image en faible grossissement permet de voir que peu de polype sont présents sur ce tissu. Sur l'image centrale il est possible d'observer un grossissement d'un polype sessile du colon moyen. L'image de droite montre un grossissement plus élevé permettant d'observer l'expansion mésenchymateuse au cœur du polype, et la structure de celui-ci. Pour la souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$, l'image en faible grossissement permet d'évaluer la charge tumorale très importante, ainsi que la localisation distale de certains des très gros polypes. Les grossissements permettent de mettre en évidence

la structure du polype, avec l'expansion mésenchymateuse, et la présence de lacs de mucines au cœur du polype. Les lacs de mucines ont été identifiés par coloration Alcian Bleu (Figure 39): ils contiennent donc des mucines acides produites par les cellules caliciformes. La présence de ces lacs dans les polypes des souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$ uniquement démontre d'un caractère mucineux du polype, ce qui peut être signe d'une tumeur plus agressive à plus long terme. Malheureusement les souris double-mutantes à 3 mois sont déjà au point limite déterminé par le comité d'éthique animale, il nous est donc impossible d'observer la progression tumorale chez des souris plus âgées.

A

		Contrôle	$Bmpr1a^{\Delta Fox11}$	$Apc^{Min/+}$	$Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$
Dilatation cryptale	Grade	-	1	1	2
	Caractérisation	-	Multifocale	Focale	Multifocale
	Localisation	-	P, M et D	D	P, M et D
Hyperplasie	Grade	-	2	1	1, une 2
	Caractérisation	-	Multifocale	Focale	Focale and Multifocale
	Localisation	-	P, M et D	D	M
Adénome	Base	-	-	Sessile et Pédiculé	Sessile et Pédiculé
	Type	-	-	Tubulaire et Tubulovilleux	Surtout Tubulaire, parfois Tubulovilleux
	Grade	-	-	Bas	Bas, un Haut
	Localisation	-	-	M et D	Surtout D, parfois M

B Adénome de haut grade:

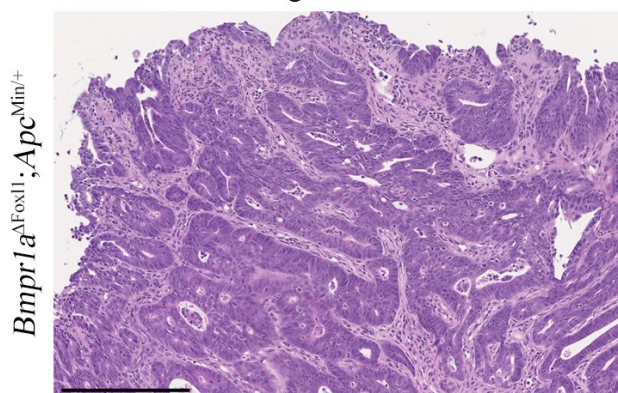


Figure 37. Aggravation histopathologique des polypes chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$ à 3 mois.

A. Tableau résumant l'analyse histopathologique réalisée par P^{re} Benoît-Biancamano. Trois souris par génotypes ont été analysées. P : proximal, M : moyen et D : distal. B. Image de l'adénome de haut grade de la souris $Bmpr1a^{\Delta Fox11};Apc^{Min/+}$. Barre d'échelle=250µm.

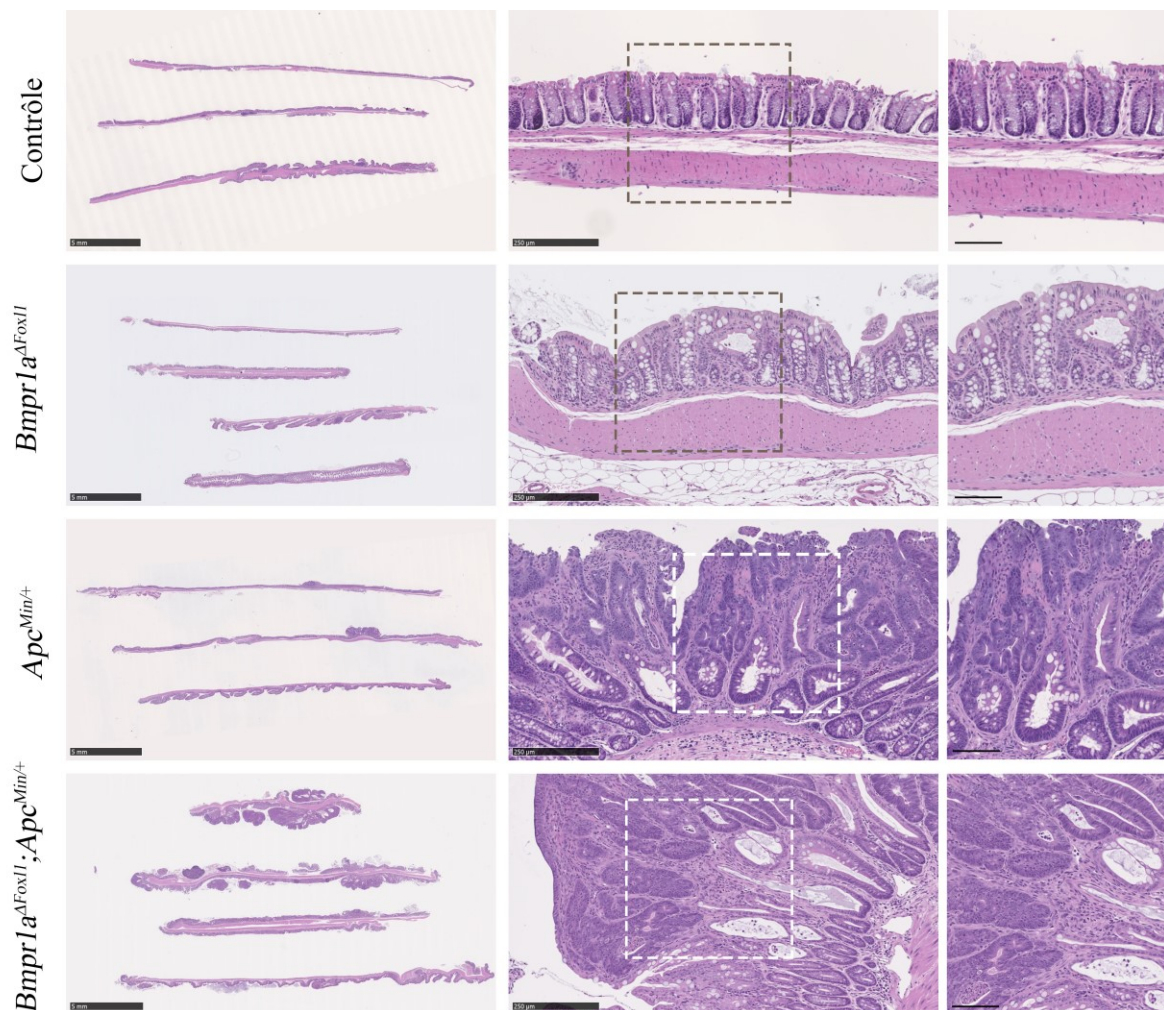


Figure 38. Histologie des colons des souris des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}; Apc^{Min/+}$ âgées de 3 mois.

Coloration H&E des colons et grossissement afin d'observer la structure des polypes; Barres : à gauche : 5mm, centre : 250 μ m, droite : 100 μ m.

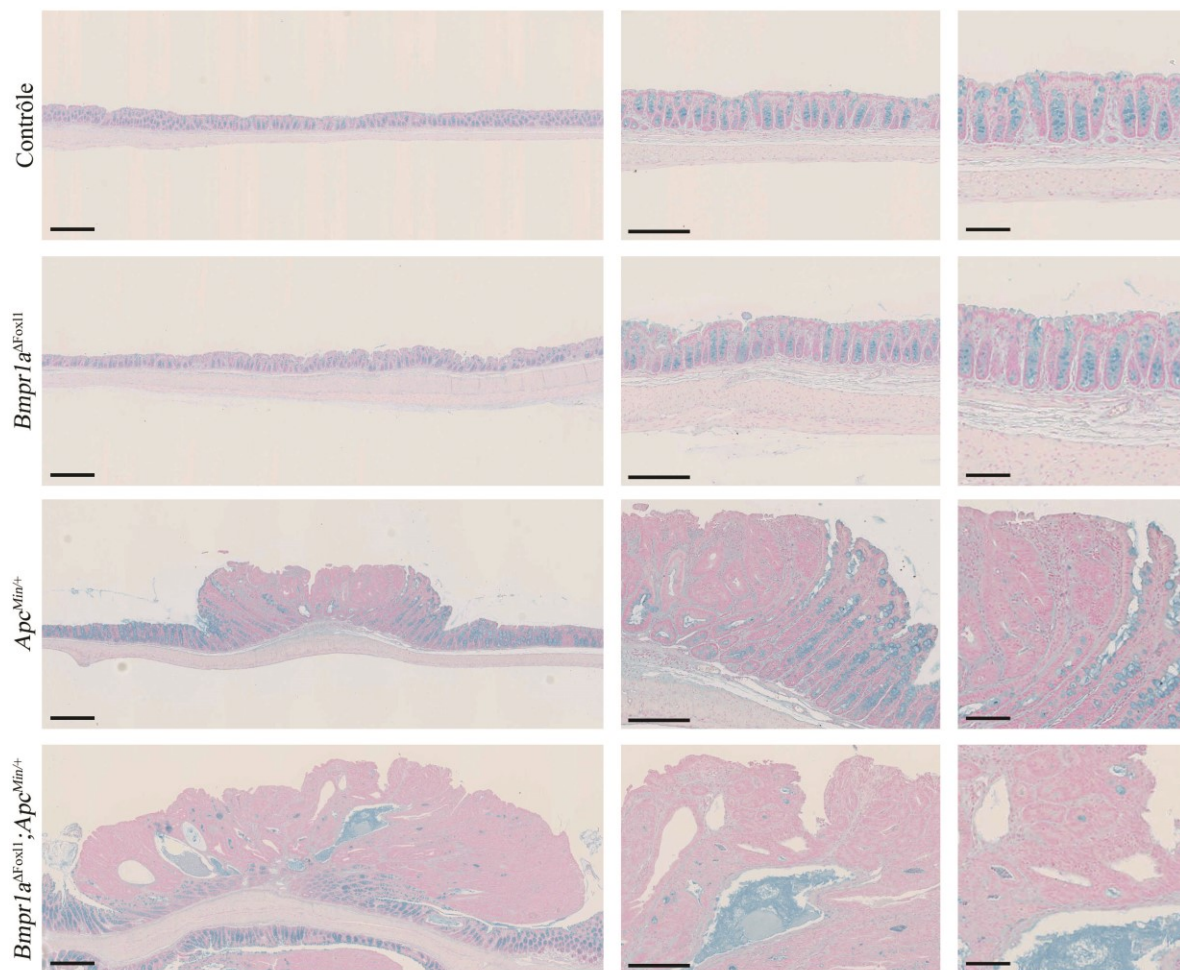


Figure 39. Analyse de la production de mucines dans les polypes des souris de 3 mois
 Coloration Alcian Bleu des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}; Apc^{Min/+}$ âgées de 3 mois. Barres d'échelle: gauche 500 μ m, centre : 250 μ m, droite : 100 μ m

L'analyse des coupes histologiques de l'intestin a permis d'observer les polypes et leur structure (Figure 40). De manière générale, les souris double-mutantes avaient des polypes plus gros que les souris $Apc^{Min/+}$, qui avaient des polypes moins avancés, comme il est possible d'observer à la Figure 40 : les polypes des souris $Apc^{Min/+}$ sont petits et restreints alors que les polypes des souris double-mutantes sont pédiculés et plus gros. Dans les iléons des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1}$, il est possible d'observer des zones démontrant une modification dans l'architecture de l'axe crypte-villosité. Dans l'image présentée à la Figure 40, une villosité semble dédoublée, et le compartiment mésenchymateux semble élargi. Ces observations ressemblent à ce qui est observé chez les souris de 9 mois, cependant de manière

moins importante. Il est donc possible d'observer un début de modification architecturale dès 3 mois chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFox11}.

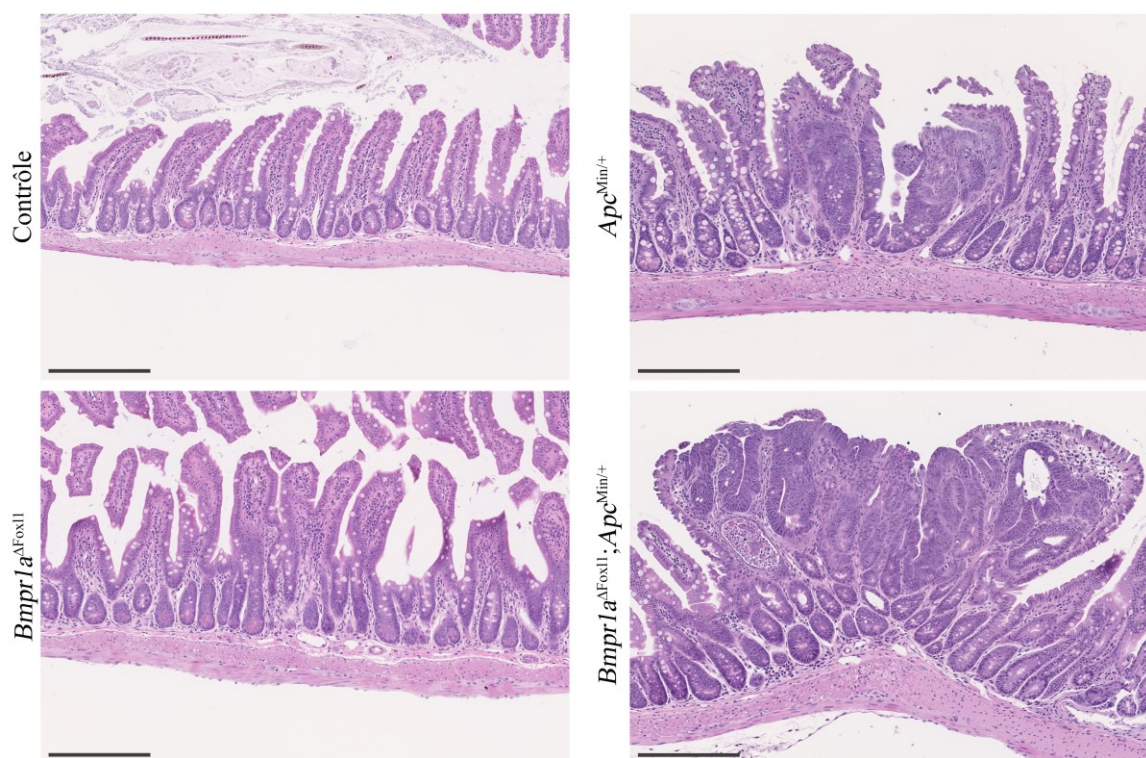


Figure 40. Histologie des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Apc*^{Min/+} âgées de 3 mois. Coloration H&E des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11};*Apc*^{Min/+} âgées de 3 mois. Barre d'échelle=250μm.

4. DISCUSSION

Le rôle de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ sur l'homéostasie intestinale n'a pas été étudié jusqu'à présent. Précédents travaux dans le laboratoire ont exploré le rôle de cette voie dans les cellules épithéliales (Auclair et al., 2007). Ils ont observé une augmentation modérée de la prolifération épithéliale, ainsi qu'une modification dans la différenciation des cellules sécrétrices. D'autres travaux dans le laboratoire menés sur le colon ont montré que la délétion de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺ entraînait une modification dans les éléments de la MEC et ainsi la formation d'un microenvironnement toxique favorisant la néoplasie (Allaire et al., 2016). Le rôle de la voie des BMPs épithéliale au niveau des cellules souches intestinales a récemment été étudié par Qi et collaborateurs (Qi et al., 2017). Ils ont montré que la voie des BMPs dans les cellules souches a pour rôle de restreindre l'expression de marqueurs de cellules souches comme LGR5, indépendamment de la voie Wnt- β -caténine. En effet, en absence de BMPR1A dans les cellules épithéliales, le nombre de cellules LGR5⁺ était augmenté par rapport aux souris contrôles. La voie des BMPs permet donc de limiter l'expansion des cellules souches dans la crypte. Cette étude a modifié les connaissances établies puisqu'elle montre que la voie des BMPs est active au fond de la crypte alors qu'il était pensé que seules les voies Wnt et Notch étaient actives au fond de la crypte et importantes pour les cellules souches. Cette étude a donc amené l'attention de la communauté scientifique vers le rôle de la signalisation des BMPs épithéliaux sur les cellules souches, mais celle des BMPs mésenchymateux sur les cellules souches reste à élucider. Les cellules FOXL1⁺ sont des cellules mésenchymateuses positionnées juste en dessous de l'épithélium intestinal et colique. Elles ont été récemment décrites comme étant des télocytes: des cellules de soutien possédant de longues protrusions permettant la transmission de signaux aux cellules environnantes (Díaz-Flores et al., 2014; Pieri et al., 2008). Elles produisent des facteurs de la niche des cellules souches intestinales comme par exemple WNT2B et RSPO1. Ces cellules soutiennent les cellules souches puisqu'en leur absence celles-ci disparaissent (Aoki et al., 2016; Shoshkes-Carmel et al., 2018). Le premier objectif de mon projet de maîtrise était d'élucider le rôle de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ dans la formation de la niche des cellules souches. Tout d'abord la niche formée

par l'épithélium a été étudiée. WNT3 est un facteur Wnt produit par les cellules de Paneth dans l'intestin participant à la niche des cellules souches intestinales (Farin et al., 2012). Les cellules de Paneth transmettent WNT3 aux cellules souches via un contact direct des membranes cellulaires, et grâce à Frizzled (Farin et al., 2016). Ce ligand va lier les récepteurs Frizzled et LRP5/6 à la surface des cellules souches, et permettre l'activation de la voie Wnt- β -caténine dans celles-ci (Nusse and Clevers, 2017). Les cellules de Paneth produisent aussi les facteurs WNT6 et WNT9 (Durand et al., 2012). Chez les souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1}, l'expression de *Wnt3* est diminuée dans les cryptes de l'intestin. Il est donc possible de penser que les cellules de Paneth des souris mutantes ne remplissent pas complètement leur fonction de production des WNTs. Cette diminution de l'expression de *Wnt3* montre que la niche épithéliale des cellules souches est affectée par la délétion de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺. Farin et collaborateurs ont montré que, chez la souris, la délétion de WNT3 dans l'épithélium intestinal n'entraînait aucune modification dans l'homéostasie du tissu. Ce résultat met en évidence la présence de sources redondantes de WNTs capables de soutenir les cellules souches intestinales (Farin et al., 2012). Ce sont les cellules mésenchymateuses subépithéliales qui produisent les facteurs WNTs complémentaires: WNT2B par exemple est produit par cellules FOXL1⁺ (Aoki et al., 2016). Une augmentation d'expression de *Wnt2b* a été mesurée dans l'iléon des souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1} par rapport aux souris contrôles. Cette augmentation est uniquement tendancielle puisque $p < 0.1$. Cependant cette donnée indique que *Wnt2b* serait une bonne piste à explorer plus en profondeur. Ces modifications dans les facteurs de la niche mésenchymateuse permettent de balancer les effets de la modification de la niche épithéliale. En effet, la niche mésenchymateuse compenserait pour essayer de soutenir les cellules souches via l'augmentation d'expression de *Wnt2b*. Les marqueurs des cellules souches intestinales ont ensuite été analysés. Les résultats du séquençage d'ARN ont permis de découvrir une diminution globale des marqueurs des cellules souches dans les iléons des souris *Bmpr1a* ^{Δ Foxl1}. En qPCR, il a été possible de mesurer une diminution significative de l'expression de *Lgr5* et *Sox9*, deux marqueurs de cellules souches intestinales. Une diminution protéique de SOX9 a été mesurée par immunobuvardage de type Western, venant confirmer le résultat de qPCR. Ces résultats indiquent que les cellules souches sont affectées par la délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺.

En 2017, Rodríguez-Colman et collaborateurs ont découvert un nouveau rôle pour les cellules de Paneth; celui de source de métabolite pour les cellules souches. En effet, ils ont montré que les cellules de Paneth possèdent une forte activité glycolytique, alors que les cellules souches utilisent davantage la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. Ils ont découvert que les cellules de Paneth utilisent le glucose mis à leur portée, réalisent la glycolyse puis transfèrent le lactate obtenu aux cellules souches voisines afin qu'elles puissent effectuer la phosphorylation oxydative. La phosphorylation oxydative produit donc des ROS (espèces réactives à l'oxygène) dans les cellules souches, ce qui active P38 et entraîne la différenciation cellulaire (Rodríguez-Colman et al., 2017). Cette étude montre que les cellules de Paneth participent à la formation de la niche des cellules souches en produisant des métabolites en plus des facteurs WNTs. Le séquençage de l'ARN des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} a permis d'identifier une diminution d'expression de nombreuses cibles associées à l'absorption des sucres comme *Slc2a2* et *Slc2a5* codant pour GLUT2 et GLUT5 respectivement. Ces récepteurs au glucose sont responsables de l'entrée du glucose dans la cellule et de sa sortie vers la circulation sanguine (Mueckler and Thorens, 2013). Si les cellules de Paneth ne possèdent pas assez de récepteurs au glucose, il se peut que le support métabolique des cellules souches soit défectueux. La fonction des cellules souches en serait ainsi affectée.

Après délétion de la β -caténine dans les cellules épithéliales intestinales de manière inductible durant 6 jours, Fevr et collaborateurs ont observé une perte de l'épithélium intestinal. Ils ont observé aussi une perte des cellules prolifératives, une diminution de c-MYC et une activation du régulateur du cycle cellulaire P21 (Fevr et al., 2007). La voie Wnt- β -caténine est donc très importante pour l'homéostasie intestinale. Un des marqueurs de cellules souches intestinales actives est LGR5, un récepteur couplé aux protéines G en mesure de lier la RSPO, potentialisateur de la voie des Wnt- β -caténine (Barker et al., 2007; de Lau et al., 2014). LGR5 et RSPO permettent d'augmenter l'intensité du signal reçu par la liaison d'un ligand WNT au récepteur Frizzled-LRP5/6. Les auteurs en concluent que les cellules souches exprimant LGR5 présentent une forte activation de la voie Wnt- β -caténine. Les analyses du séquençage d'ARN de l'iléon des souris *Bmpr1a*^{ΔFox11} ont permis de confirmer que les cibles de la voie Wnt- β -caténine étaient sur-exprimées par rapport à ce qui est observé chez les souris contrôles. L'analyse de la localisation de la β -caténine dans les

cryptes des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} a montré une augmentation du nombre de cellules présentant une accumulation de β-caténine au noyau par rapport aux souris contrôles et cela a été confirmé par immunobuvardage contre la β-caténine active. Ces résultats montrent donc qu'il y a plus de β-caténine active dans les cryptes des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} que dans celles des souris contrôles, la voie Wnt-β-caténine est donc suractivée dans l'épithélium intestinal des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. La voie Wnt-β-caténine active la transcription de la cycline D1, protéine impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Takahashi-Yanaga et Sasaguri, 2008; Vadlakonda et al., 2013). La baisse d'expression des marqueurs des cellules souches combinée avec l'augmentation de la voie Wnt chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} sont associées à une augmentation du nombre de cellules prolifératives dans les cryptes, identifiées par immunofluorescence contre Ki67. Ki67 est exprimée pendant toutes les phases actives du cycle cellulaire, soit les phases G1, S, G2 et M (Scholzen et Gerdes, 2000). L'analyse des résultats du séquençage d'ARN a montré une augmentation d'expression des protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme PCNA et Cycline B1 chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} par rapport aux souris contrôles. Ces résultats suggèrent que le nombre de cellules prolifératives est augmenté dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} par rapport aux contrôles.

L'analyse des cellules différenciées a permis de découvrir la présence de cellules absorbantes dans la crypte des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. La sucrase-isomaltase est exprimée uniquement chez les cellules absorbantes différenciées de manière terminale (Traber et al., 1992). La détection de la sucrase-isomaltase par immunofluorescence dans les iléons des souris a permis de localiser des cellules absorbantes dans les cryptes des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} alors que son expression est limitée aux cellules présentes dans la villosité chez les souris contrôles. Ce résultat montre que la différenciation des cellules absorbantes est modifiée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Noggin est un inhibiteur de la voie des BMPs puisqu'il peut lier les ligands BMPs et empêcher leur liaison aux récepteurs (Groppe et al., 2002). Noggin participe donc au maintien de l'équilibre entre la voie des BMPs et celle de Wnt dans le fond de la crypte et appartient aux facteurs composant la niche des cellules souches (Yeung et al., 2011). Une forte diminution d'expression de *Noggin* a été mesurée dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} par rapport aux souris contrôles. Cette diminution laisse penser que la voie des BMPs est plus active dans les cellules épithéliales cryptales des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} que le niveau basal présent chez les souris contrôles. Cette potentielle activation de la voie de

signalisation des BMPs pourrait donc entraîner donc la différenciation précoce des cellules absorbantes exprimant la sucrase-isomaltase. Les cellules progénitrices prolifératives se situent dans les cryptes intestinales. Tel que dit précédemment, une augmentation du nombre de cellules prolifératives a été observée dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. Ces résultats suggèrent donc la présence de cellules prolifératives différenciées dans les cryptes des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. La régulation de la transition des cellules intestinales prolifératives vers des cellules différenciées est complexe. Elle est régulée en partie par l'équilibre de la voie p42/p44 MAPK: la voie est très active chez les cellules prolifératives et son activité est diminuée chez les cellules différenciées (Aliaga et al., 1999). Le cycle cellulaire des cellules différenciées est ainsi bloqué en phase G1, elles ne prolifèrent donc plus. Or, il est possible que les cryptes des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} présentent des cellules prolifératives exprimant des marqueurs de cellules différenciées comme la sucrase-isomaltase. La délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ dérégule donc l'équilibre entre la prolifération et la différenciation dans les cellules épithéliales intestinales.

La voie de Notch est importante pour le maintien des cellules souches (Pellegrinet et al., 2011). En effet, en absence de la voie de Notch dans les cellules épithéliales intestinales, les cellules souches cessent de proliférer et l'expression de leurs marqueurs, dont LGR5 et OLFM4 diminue (Demitrack et Samuelson, 2016; VanDussen et al., 2012). De plus, ces études ont montré que l'inhibition de la voie de Notch est associée à une augmentation d'ATOH1 et à une forte augmentation du nombre de cellules de la lignée sécrétrice. HES1 est une cible transcriptionnelle directe de la voie Notch (Iso et al., 2003). HES1 régule l'expression d'ATOH1 en se liant au promoteur, empêchant ainsi l'expression du gène (Zheng et al., 2011). Cette régulation permet de contrôler la différenciation de cellules progénitrices en cellules sécrétrices et absorbantes. Dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, les résultats du séquençage d'ARN ont montré que les cibles de la voie de Notch sont diminuées. L'expression de *Hes1* dans les cellules épithéliales de la crypte des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} est également diminuée. De plus, la baisse d'expression de marqueurs de cellules souches et l'augmentation du nombre de cellules caliciformes est en corrélation avec la diminution de la voie de Notch chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. En revanche, contrairement à ce qui avait été montré par VanDussen et collaborateurs, l'expression d'*Atoh1* dans les cryptes intestinales des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} est diminuée et non augmentée. Ce résultat

contradictoire est difficile à réconcilier cependant plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ces observations. La baisse d'expression de *Hes1* combinée à celle d'*Atoh1* peuvent être le signe d'une diminution du nombre de cellules progénitrices dans les cryptes. Puisque les cellules se différencient précocement, la crypte serait constituée d'un plus petit nombre de cellules souches, de moins de cellules progénitrices mais de plus de cellules différenciées pourtant encore prolifératives. Cela expliquerait la diminution de l'expression de ces marqueurs de cellules progénitrices. Une étude datant de 2008 a identifié ATOH1 comme étant une cible de la voie des BMPs. En effet, traiter les cellules avec BMP2 ou BMP4 entraînait une diminution d'ATOH1 au niveau protéique, mais pas au niveau de l'ARN (Zhao et al., 2008). Les ligands BMPs produits par le mésenchyme ou l'épithélium pourraient ainsi contrôler l'expression d'ATOH1 dans les cellules épithéliales. Ce résultat montre un lien entre la voie des BMPs et ATOH1 au niveau post-transcriptionnel, mais ne permet pas de comprendre la baisse d'expression d'*Atoh1* dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} puisque celle-ci est au niveau de l'ARN. Stojanova et collaborateurs ont déterminé que l'expression d'*Atoh1* dans la cochlée était contrôlée par des modifications épigénétiques comme l'acétylation de son promoteur (Stojanova et al., 2015). La modulation d'expression d'*Atoh1* dans l'épithélium des cryptes des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} pourrait donc être expliquée par une modification épigénétique. Ces études montrent que l'expression d'ATOH1 semble pouvoir être régulée par des mécanismes épigénétiques et post-traductionnels. Une étude effectuée par Leow et collaborateurs a montré que l'inactivation de la voie Wnt menait à une augmentation de l'expression de HATH1 dans les cellules de cancer colorectal humain HT29. HATH1 est l'homologue humain d'ATOH1 (Leow et al., 2004). Ils ont aussi montré que HATH1 pouvait diminuer la prolifération cellulaire des cellules HT29, et que l'expression de HATH1 était diminuée dans les tumeurs de patients atteints de CCR. Ces résultats ont été confirmés par Tsuchiya et collaborateurs en 2007 (Tsuchiya et al., 2007). Ils concluent donc que HATH1 est une cible de la voie Wnt-β-caténine et qu'il régule la prolifération cellulaire. Puisque la voie de Wnt est suractivée dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, il serait donc logique d'y observer une diminution de l'expression d'*Atoh1*. De plus, la diminution d'*Atoh1* permet aussi d'expliquer l'hyper-prolifération observée dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, en plus d'affecter la différenciation des cellules progénitrices. Pour résumer, la diminution de *Hes1* pourrait être expliquée par la diminution de l'activité de la voie Notch

chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, et la diminution d'*Atoh1* serait expliquée par l'activation de la voie Wnt-β-caténine.

L'irradiation crée des dommages à l'ADN très importants au sein des cellules (Borrego-Soto et al., 2015). Les radiations sont plus létales pour les cellules se divisant rapidement, comme les cellules souches (Blanpain et al., 2011). C'est pourquoi les cellules souches actives sont détruites suite à l'irradiation. Les cellules quiescentes vont quant à elles survivre, remplacer les cellules souches actives et permettre la régénération de l'épithélium intestinal (Kim et al., 2017). L'irradiation permet donc de vérifier la fonctionnalité des cellules souches quiescentes d'un tissu. Chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, une diminution de l'expression des marqueurs de cellules souches intestinales a été observée, il a donc été intéressant d'évaluer leur potentiel régénératif après irradiation. Tel qu'identifié par qPCR, les marqueurs diminués appartiennent autant aux cellules souches actives (*Lgr5*) que progénitrices (*Sox9* particulièrement). SOX9 a été identifié comme un marqueur des cellules souches en mesure de reformer les cellules LGR5⁺ après irradiation. Une baisse de SOX9 dans les cryptes des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} laissait suggérer un possible problème de réparation chez les souris mutantes suite à l'irradiation. Quatre jours après l'irradiation de 12Gy, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} étaient aussi physiquement affectées que les souris contrôles, et l'histologie du tissu comportait les mêmes types de zones: des zones en forte régénération et d'autres très fortement atteintes. Au sein d'une zone de prolifération, les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} comportaient plus de cellules prolifératives marquées au BrdU que les souris contrôles. Cette augmentation peut être expliquée de plusieurs façons. Premièrement, le besoin en cellules pourrait être plus important chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} donc les cellules progénitrices doivent proliférer plus afin de régénérer le tissu. Il est possible que les cellules présentes chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ne remplissent pas bien leurs fonctions, il serait donc important de produire de nouvelles cellules fonctionnelles. Une autre hypothèse serait que le tissu est en bonne voie de régénération et l'hyper-prolifération serait due à un dérèglement dans une voie de signalisation comme la voie Wnt-β-caténine. Puisque l'activité de la voie Wnt-β-caténine est déjà augmentée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} sans irradiation, il est possible de penser que cette dernière possibilité est la plus plausible. Il serait cependant intéressant de tester cette hypothèse en comparant le nombre de cellules où la β-caténine est active chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} par rapport aux souris contrôles, et en testant l'expression des cibles de la voie

comme *Axine2* et *CyclinB1* en RT-qPCR. Ces résultats montrent donc que la régénération n'est pas affectée chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} par rapport aux contrôles, mais que la prolifération des cellules épithéliales est modulée à la hausse. L'irradiation du corps entier affecte aussi les cellules de la moelle épinière et donc les souris décèdent d'un manque de cellules hématopoïétiques (Nunamaker et al., 2013) en plus des dommages intestinaux.

La fibrose liée aux radiations est très commune chez les patients recevant un traitement de radiothérapie. La fibrose entraîne une atrophie importante du tissu (Westbury et Yarnold, 2012). Dans l'intestin, la fibrose est associée au dépôt de collagène dans la MEC, entraînant une augmentation de la rigidité matricielle (Giannandrea et Parks, 2014; Wynn, 2008). L'analyse des iléons des souris irradiées par la coloration des fibres de collagène par Trichrome de Masson a identifié une accumulation de collagène en haut des villosités chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} uniquement. La présence de collagène I a été confirmée par immunofluorescence. Cette accumulation de collagène n'a pas été corrélée avec une diminution du nombre de cellules apoptotiques, contrairement à ce qui avait été observé dans des cellules en culture par Azorin et collaborateurs (Azorin et al., 2012). Il est important de préciser que leurs analyses ont été réalisées *in vivo*, et qu'aucune autre étude n'a confirmé leurs résultats. Le collagène I est produit par les cellules mésenchymateuses, particulièrement par les myofibroblastes (Wynn, 2008). Une accumulation de collagène I est observée chez des patients atteints d'une condition rare appelée «*Collagenous Sprue*». Cette maladie est caractérisée par une atrophie des villosités et une accumulation de collagène sous l'épithélium du haut des villosité (Daum et al., 2006). L'architecture des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} âgées de 9 mois montre une atrophie des villosités cependant moins sévère que celle observée chez les patients atteints de *Collagenous Sprue* (Rubio–Tapia et al., 2010). Le *Collagenous Sprue* est souvent associé à la maladie céliaque, et chez certains patients une diète sans gluten permet de ramener l'architecture intestinale à la normale (Rubio–Tapia et al., 2010). Nous voulions donc vérifier si les souris irradiées présentaient d'autres signes présents dans la maladie céliaque, soit la présence de lymphocytes T intra-épithéliaux. L'infiltration des lymphocytes T au niveau de l'épithélium active la réponse immunitaire en produisant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, caractéristiques de la maladie céliaque (Kelly et al., 2015; Parzanese et al., 2017). Chez les souris irradiées, aucune augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ n'a été mesurée dans les iléons des souris

Bmpr1a^{ΔFoxl1} par rapport aux souris contrôles. La maladie cœliaque est une maladie multifactorielle reposant cependant sur une caractéristique génétique amenant une susceptibilité à développer la maladie (Kelly et al., 2015). Or, les souris étudiées n'ont pas cette susceptibilité donc il est peu probable que les souris irradiées souffrent de la maladie cœliaque comme tel; il est possible qu'elles souffrent d'un autre type d'entéropathie.

Une mutation dans la voie Wnt est un événement précoce du développement d'un cancer colorectal (Powell et al., 1992). Chez l'humain, une mutation héréditaire dans *APC* entraîne l'apparition du syndrome de polypose adénomateuse familiale constituant 1% des CCRs (Mansoor-ul-Haq et Faisal, 2011). Plusieurs modèles murins disponibles permettent d'étudier l'initiation de la tumorigenèse, dont le modèle des souris *Apc*^{Min/+} (Moser et al., 1990). Les souris *Apc*^{Min/+} présentent une mutation dans la protéine APC, l'empêchant de lier la β-caténine avec les autres protéines du complexe. La β-caténine n'est donc plus dégradée et cela entraîne la suractivation de la voie Wnt-β-caténine (Zeineldin et Neufeld, 2013). Ce qui rend ce modèle idéal pour l'étude de l'initiation de la néoplasie est le fait qu'un seul allèle du gène *Apc*^{Min} est muté. La perte du 2^{ème} allèle est nécessaire pour suractiver la voie et entraîner le développement de polypes (Luongo et al., 1994). Ce modèle permet donc d'évaluer l'instabilité génomique présent dans le tissu favorisant la perte du 2^{ème} allèle (Yamada et al., 2002). Ce modèle met donc l'emphase sur la collaboration entre l'environnement et la susceptibilité génétique dans le développement de la néoplasie. Les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} ont été croisées avec les souris *Apc*^{Min/+} afin d'obtenir des souris double-mutantes: *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}; *Apc*^{Min/+}. Une augmentation importante du nombre de polypes est observée, dans l'intestin et le colon des souris double-mutantes par rapport aux souris *Apc*^{Min/+}. Les souris *Apc*^{Min/+} développent beaucoup de polypes dans l'intestin grêle et peu dans le colon, alors que les patients atteints du syndrome de polypose adénomateuse familiale ont de nombreux polypes dans le colon, principalement dans le colon distal (Sodir et al., 2006). Il est très intéressant de remarquer que les souris double-mutantes possèdent de nombreux polypes dans le colon distal, ce qui se rapproche de ce qui est vu chez l'humain, et que ces polypes sont très gros. L'analyse du grade histologique de ces polypes a identifié des adénomes de bas grade, sauf dans un cas où le polype était un adénome de haut grade. Les adénomes des souris *Apc*^{Min/+} n'évoluent jamais vers les grades supérieurs (Moser et al., 1990). Ces résultats montrent donc que les souris double-mutantes ont une charge tumorale

accrue, et que ces polypes auraient du potentiel pour devenir agressifs. Malheureusement, la santé des souris doubles-mutantes approche le point limite déterminé par le comité d'éthique animale, il est donc impossible d'étudier des souris plus vieilles que 90 jours. Peut-être qu'il aurait été possible d'observer un plus grand nombre d'adénome de haut grade chez des souris âgées de 120 jours. Afin d'évaluer l'impact de la délétion de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ sur l'initiation de la polypose, des souris âgées de 1 mois ont été analysées, afin de voir s'il y avait la perte du 2^{ème} allèle d'*Apc*^{Min}. Pour l'analyse des souris de 1 mois, une méthode par PCR n'a pas été fructueuse, une autre technique par analyse histologique et immunohistochimie contre la β -caténine a été investiguée mais des problèmes techniques m'ont empêché de mener cette piste à bien. L'augmentation du nombre de polypes à 3 mois montre que l'événement de perte du 2^{ème} allèle est plus fréquent chez les souris double-mutantes que chez les souris *Apc*^{Min/+} puisque la perte du 2^{ème} allèle est nécessaire pour la formation des polypes (Luongo et al., 1994). Cela est donc un fort indicateur que la mutation de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ crée un microenvironnement toxique favorisant l'instabilité génomique et ainsi l'initiation de la néoplasie. L'origine des cellules cancéreuses a été étudiée dans plusieurs études, et deux théories en sont issues: la théorie du haut vers le bas («*top down*») et celle du bas vers le haut («*bottom up*») (Preston et al., 2003; Schwitalla et al., 2013; Shih et al., 2001). La première théorie, celle du haut vers le bas a pris l'origine d'observations histologiques puis les auteurs ont observé que le haut de l'épithélium présentait des zones dysplasiques, mais les cryptes semblaient rester normales. Ils ont postulé que les cellules tumorales étaient en mesure d'acquérir des fonctions de cellules souches et de les remplacer. Dans l'autre modèle, les cellules souches sont à l'origine de la néoplasie et le polype provient donc d'une même cellule souche déficiente, et cela se transmet par fission cryptale aux cryptes avoisinantes. La notion de cellule souche cancéreuse est de plus en plus étudiée. Si *Apc* est muté dans les cellules LGR5⁺ seulement, des adénomes seront observables 3 semaines après l'induction de la délétion d'*Apc*. Ces résultats prouvent que les cellules cancéreuses peuvent être issues des cellules LGR5⁺ (Barker et al., 2009). Il est donc possible de postuler que la délétion de *Bmpr1a* dans les cellules FOXL1⁺ affecte la cellule souche LGR5⁺ d'une manière à favoriser sa transformation en cellule souche cancéreuse. Il serait donc très intéressant de localiser les cellules LGR5⁺ dans les polypes coliques des souris double-mutantes.

5. CONCLUSION

Les cellules FOXL1⁺ produisent des facteurs composant la niche des cellules souches intestinales sans lesquels les cellules souches ne sont pas viables. La voie de signalisation contrôlant la production de ces facteurs n'a pas encore été identifiée. Le projet de recherche présenté dans ce mémoire a pour but d'évaluer le rôle de la voie des BMPs dans la composition de la niche des cellules souches intestinales, le maintien des cellules souches et leur devenir. À l'aide d'un modèle murin permettant la délétion du récepteur BMPRI1A dans les cellules FOXL1⁺ uniquement, il a été possible de répondre à cet objectif. La perte de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ a entraîné la diminution importante de l'expression de Noggin, un inhibiteur de la voie des BMPs. En absence de Noggin, il semble que les cellules de la crypte se différencient très précocement puisque des cellules absorbantes exprimant la sucrase-isomaltase ont été observées dans la crypte. La niche épithéliale des cellules souches est affectée par la perte de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺. Effectivement, les cellules de Paneth subissent une augmentation de la taille de leurs granules de sécrétion et une diminution de l'expression de *Wnt3*. La perte de WNT3 pourrait être compensée par une augmentation d'expression de *Wnt2b* par les cellules FOXL1⁺, ce résultat reste cependant à confirmer. Malgré la compensation mésenchymateuse, les cellules souches sont affectées. De nombreux marqueurs de cellules souches diminuent en absence de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺. La voie de Wnt-β-caténine est fortement activée en réponse à la baisse du nombre de cellules souches, cela permet d'activer la prolifération des cellules filles et de maintenir le flot de régénération des cellules épithéliales. Une augmentation de cellules prolifératives est donc observée dans les iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. De plus, la modification dans la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺ diminue l'activité de la voie de Notch. Cette diminution est associée à une augmentation du nombre de cellules caliciformes dans l'intestin des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. L'utilisation du modèle de souris *Apc*^{Min/+} avec la souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} permet d'analyser la synergie entre un mésenchyme déficient et un épithélium prone à la néoplasie. La combinaison des deux entraîne une augmentation du nombre de polypes dans le système digestif des souris. Cela suggère qu'un mésenchyme toxique associé à un épithélium enclin à la formation d'adénome

installe une instabilité génomique favorisant la perte du 2^{ème} allèle d'*Apc*^{Min} et ainsi promeut la formation de multiples adénomes. Ce projet a mis en lumière le rôle de la voie des BMPs dans les cellules mésenchymateuses FOXL1⁺ dans la formation et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium. Ce projet montre donc l'importance de la communication entre le mésenchyme et l'épithélium dans un cadre d'homéostasie mais aussi dans le développement de pathologies.

6. PERSPECTIVES

Afin d'approfondir l'analyse des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, il serait pertinent de réaliser l'analyse protéomique des tissus de ces souris afin de comparer les résultats obtenus avec ceux du séquençage d'ARN. De nombreuses modifications post-traductionnelles pourraient affecter les protéines mais pas l'ARN. Les protéines sont évidemment les molécules effectrices en biologie, alors les informations obtenues en protéomique reflètent l'action réalisée dans le tissu. L'analyse protéomique permettrait entre autres d'identifier la composition de la MEC chez les souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}. La MEC est impliquée dans le développement de la fibrose, du CCR et des maladies inflammatoires intestinales. Des éléments de la MEC participent sûrement à la niche des cellules souches puisque la matrice contrôle l'accès des facteurs solubles aux cellules souches. Il serait donc très intéressant d'analyser la composition matricielle des iléons des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}.

La culture d'entéroïdes à partir des cryptes des intestins des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} permettrait d'évaluer la capacité des cellules souches à vivre en dehors de leur niche. Cela permettrait d'évaluer les conséquences de la délétion de la voie à long terme sur les cellules souches: les entéroïdes sont réalisés à partir d'intestin de souris âgées de 3 mois en général, les cellules souches ont donc vécu 3 mois dans un microenvironnement toxique. Il se pourrait que des modifications à long terme affectent la capacité des cryptes des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} à former des entéroïdes. La culture des entéroïdes nécessite un milieu de culture additionné de RSPO1 et de Noggin. Puisqu'une forte diminution de Noggin a été mesurée dans les tissus des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, il serait intéressant de comparer la capacité des cellules souches des souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1} et des souris contrôles à former des entéroïdes dans des milieux de culture contenant différentes quantités de Noggin. Grâce aux entéroïdes il serait aussi intéressant de regarder le statut de la niche métabolique des cellules souches. C'est-à-dire de vérifier que les cellules de Paneth réalisent bien la glycolyse afin de transmettre le lactate aux cellules souches et que les cellules des entéroïdes issus des souris mutantes présentent eux aussi une diminution d'expression de *Glut2* et *Glut5*. Pour cela il serait possible d'utiliser des inhibiteurs de glycolyse ou de phosphorylation oxydative tel qu'effectué par Rodriguez-Colman et collaborateurs (Rodríguez-Colman et al., 2017), ou bien de comparer les

métabolomes définis par spectrométrie de masse. Au niveau des iléons de souris *Bmpr1a*^{ΔFoxl1}, il serait aussi pertinent d'évaluer l'expression des protéines régulant l'expression de la Sucrase-Isomaltase comme CDX2, GATA4. Cela permettrait de comprendre comment la différenciation précoce se déroule dans la crypte.

L'utilisation de modèles rapporteurs faciliterait beaucoup la continuation de ce projet. Les modèles rapporteurs permettent de marquer les cellules ayant subi la recombinaison des séquences loxP par la Cre-recombinase. La souris ROSA^{mTmG} en est un exemple: s'il y a recombinaison du locus ROSA, la GFP sera exprimée à la membrane plasmique. Premièrement, cela permettrait de localiser les cellules FOXL1⁺ ayant perdu *Bmpr1a*, et de confirmer la perte d'activation des SMADs 1/5/8 par immunofluorescence. Cette confirmation permettrait de s'assurer que le récepteur BMPRII ne compense pas pour la perte de BMPRI1A. Ensuite, cela permettrait de les trier par FACS et de réaliser le séquençage de l'ARN de ces cellules afin d'identifier les cibles transcriptionnelles des SMADs dans ces cellules de manière spécifique. Le triage par FACS permettrait aussi de les mettre en culture et de réaliser de la co-culture avec des entéroïdes afin d'observer si les cellules FOXL1⁺ BMPRI1A⁻ peuvent supporter la croissance des organoïdes comme les cellules FOXL1⁺ BMPRI1A⁺ en sont capables. Puisque l'expression de *Lgr5* diminue dans les intestins des souris mutantes, il serait vraiment intéressant de faire l'analyse des cellules LGR5⁺ uniquement. Cela serait faisable en utilisant la souris *Lgr5*-GFP, dans laquelle les cellules LGR5⁺ expriment la protéine GFP, permettant ainsi leur localisation et leur isolation par FACS. Ces expériences sont coûteuses mais elles permettraient d'élucider plusieurs mécanismes importants, et ce avec des techniques à haut débit donnant un maximum d'information. Il serait aussi intéressant d'évaluer les niveaux d'activation des Smads1/5/9 dans les cellules épithéliales des cryptes, afin de vérifier que la diminution de *Noggin* entraîne bien une activation de la voie des BMPs dans l'épithélium. Il serait aussi intéressant d'analyser l'activation d'AKT par immunobuvardage de type Western, par exemple. En effet, AKT peut agir sur la voie Wnt- β-caténine en inactivant GSK3β entraînant l'accumulation de la β-caténine active et donc l'activation de la voie Wnt-β-caténine (Anderson et Wong, 2010). Cela permettrait de savoir si l'activation de la voie Wnt-β-caténine observée dans l'épithélium est une conséquence de l'activation d'AKT en réponse à la perte de la voie des BMPs dans les cellules FOXL1⁺.

Pour l'étude de la régénération tissulaire après irradiation, il serait intéressant de faire l'irradiation sur l'abdomen uniquement au lieu d'irradier tout le corps. Cela permettrait d'éviter les dommages à la moelle épinière des souris, et donc cela permettrait peut-être de laisser les souris vivre un peu plus et d'observer le phénotype plus tardivement. Il serait aussi intéressant de sacrifier les souris plus tôt, peut-être 1 jour après irradiation afin d'observer la situation au début des dommages, et d'analyser la réponse précoce aux dommages. Il serait aussi intéressant de comparer l'activation de la voie Wnt- β -caténine entre les souris contrôles et *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} afin de voir si la prolifération est associée à une suractivation de la voie. Il faudrait aussi caractériser les cellules souches présentes dans le tissu en mesurant l'expression de différents marqueurs des cellules souches actives et quiescentes. Cela permettrait peut-être d'identifier les types de cellules souches repeuplant l'épithélium chez la souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} par rapport à la souris contrôle. Il serait aussi intéressant de localiser et de quantifier les myofibroblastes dans les tissus des souris irradiées. En effet, ces cellules actives produisent des éléments de la MEC ainsi que des molécules inflammatoires et pourraient varier entre les souris contrôles et *Bmpr1a* ^{Δ Fox11}.

Après l'irradiation des souris de nombreuses pistes se sont ouvertes à propos des maladies de malabsorption intestinale. Les iléons des souris irradiées ont été analysés mais dans la maladie céliaque et le *Collagenous Sprue*, le phénotype est le plus important dans la section proximale de l'intestin, soit le duodénum. Il serait donc intéressant de vérifier la présence d'accumulation de collagène et l'infiltration des lymphocytes T dans le duodénum des souris irradiées et non-irradiées. Il serait aussi intéressant d'analyser le phénotype des souris non-irradiées mises sur une diète sans-gluten. De nombreuses cibles identifiées par séquençage d'ARN étaient métaboliques, tels que des récepteurs au glucose comme GLUT2 et GLUT5 ou des transporteurs de glucose et d'acides aminés. Ces cibles étaient diminuées dans les iléons des souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11}. Cela indique que les souris *Bmpr1a* ^{Δ Fox11} ont un problème métabolique, d'autant plus qu'elles deviennent très maigres après l'âge d'un an par rapport aux souris contrôles. Il serait donc aussi intéressant d'évaluer leurs capacités métaboliques en plaçant les souris dans des cages métaboliques. Ces résultats laissent entrevoir un nouveau rôle pour le mésenchyme, celui de réguler l'absorption par les cellules épithéliales et donc le métabolisme.

Au niveau des souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Apc^{Min/+}$, il serait important de confirmer la présence des dommages à l'ADN en réalisant une immunofluorescence contre $\gamma H2AX$ par exemple. Cela permettrait de vérifier l'augmentation de l'instabilité génomique chez les souris $Bmpr1a^{\Delta Foxl1};Apc^{Min/+}$ par rapport aux souris $Apc^{Min/+}$. Il serait intéressant de localiser les cellules souches dans les polypes des tissus de ces souris en réalisant une immunofluorescence contre OLFM4 ou une hybridation in-situ contre *Lgr5*.

7. REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier la P^{re} Nathalie Perreault de m'avoir accueillie dans son laboratoire, d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de développer mes aptitudes scientifiques au sein d'un environnement de travail stimulant et agréable.

A la P^{re} Marie-Josée Boucher, merci de m'avoir accompagnée dans mon parcours en participant à mon comité d'encadrement et en évaluant mon mémoire.

Merci à la P^{re} Nathalie Fauchaux d'avoir pris le temps d'évaluer mon mémoire en tant qu'évaluatrice externe au programme.

Je remercie aussi le P^r François Boudreau de m'avoir guidée lors de ma maîtrise quand mes résultats paradoxaux étaient difficiles à concilier; merci de m'avoir aidée à y voir plus clair.

Aux membres du labo Perreault, mille merci ! Véronique, Camille, Vilcy et Ariane merci pour votre aide, votre collaboration et votre amitié pendant ces deux ans. Je suis reconnaissante d'avoir eu comme collègues des personnes généreuses, accueillantes et intelligentes. Je me souviendrai toujours des merveilleux moments passés en votre compagnie à admirer les montagnes de Banff.

Merci à Christine pour son aide précieuse avec le qPCR et les organoïdes ainsi que pour son sourire quotidien et sa passion pour la science. Merci aussi d'avoir aimé SpaceMountain assez pour le refaire ! Merci à toute l'équipe du labo Boudreau pour votre enthousiasme et tous les bons moments passés en votre compagnie.

Merci infiniment à ma « famille québécoise »: mes amis du baccalauréat (Cyntia, Coraline et Victoire) pour votre soutien au tout début de cette grande aventure qui m'a amenée où je suis aujourd'hui. Merci les filles de m'avoir accueillie les bras grands ouverts ! Merci aux amis du groupe des anciens pour tous vos conseils, blagues et invitations. Sans vous toute mon expérience aurait été si différente et sûrement moins couronnée de succès ! Une dernière mention, et non des moindres, à Jasmin. Merci d'écouter toutes mes «constatations» avec patience, de me faire rire tous les jours. Je te remercie de me faire découvrir ce que le Québec a à offrir. Merci enfin de m'aider à aller plus loin.

Pour finir je remercie du fond du cœur ma famille de m'avoir soutenue dans ce choix d'étudier au Québec. Merci de vous être intéressés à mon projet et mon domaine, en plus d'avoir cru en moi jusqu'au bout et de m'avoir poussée à réussir.

8. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Adegboyega, P.A., Mifflin, R.C., DiMari, J.F., Saada, J.I., and Powell, D.W. (2002). Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126, 829–836.
- Aliaga, J.C., Deschênes, C., Beaulieu, J.F., Calvo, E.L., and Rivard, N. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol.* 277, G631-641.
- Allaire, J.M., Roy, S.A.B., Ouellet, C., Lemieux, É., Jones, C., Paquet, M., Boudreau, F., and Perreault, N. (2016). Bmp signaling in colonic mesenchyme regulates stromal microenvironment and protects from polyposis initiation: Myofibroblast bmp signaling in polyp microenvironment. *Int. J. Cancer* 138, 2700–2712.
- Allaire, J.M., Morampudi, V., Crowley, S.M., Stahl, M., Yu, H., Bhullar, K., Knodler, L.A., Bressler, B., Jacobson, K., and Vallance, B.A. (2017). Frontline defenders: goblet cell mediators dictate host-microbe interactions in the intestinal tract during health and disease. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 314, G360–G377.
- Anderson, E.C., and Wong, M.H. (2010). Caught in the Akt: Regulation of Wnt signaling in the intestine. *Gastroenterology* 139, 718–722.
- Andoh, A., Bamba, S., Brittan, M., Fujiyama, Y., and Wright, N.A. (2007). Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacol. Ther.* 114, 94–106.
- Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C.L., Golson, M.L., Zahm, A.M., Ray, M., Wisner, C.L., Wright, C.V.E., et al. (2016). Foxl1-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 175–188.
- Asfaha, S. (2015). Intestinal stem cells and inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 25, 62–66.
- Auclair, B.A., Benoit, Y.D., Rivard, N., Mishina, Y., and Perreault, N. (2007). Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Essential for Terminal Differentiation of the Intestinal Secretory Cell Lineage. *Gastroenterology* 133, 887–896.
- Axelrod, J.D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Perrimon, N. (1996). Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science* 271, 1826–1832.
- Azorin, E., González-Martínez, P.R., and Azorin, J. (2012). Collagen I confers gamma radiation resistance. *Appl. Radiat. Isot.* 71, 71–74.

- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 19–33.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003–1007.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* *457*, 608–611.
- Battle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., Pawson, T., and Clevers, H. (2002). B-Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB. *13*.
- Beaulieu, J.F. (1992). Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* *102*, 427–436.
- Beaulieu, J.-F., and Vachon, P.H. (1994). Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* *106*, 829–839.
- Bengtsson, L., Schwappacher, R., Roth, M., Boergermann, J.H., Hassel, S., and Knaus, P. (2009). PP2A regulates BMP signalling by interacting with BMP receptor complexes and by dephosphorylating both the C-terminus and the linker region of Smad1. *J. Cell Sci.* *122*, 1248–1257.
- Bertrand, F.E., Angus, C.W., Partis, W.J., and Sigounas, G. (2012). Developmental pathways in colon cancer: Crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle* *11*, 4344–4351.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 356–368.
- Birchenough, G.M.H., Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Bergström, J.H., and Hansson, G.C. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* *8*, 712–719.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., and Passegué, E. (2011). DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* *8*, 16–29.
- Bobacz, K., Gruber, R., Soleiman, A., Erlacher, L., Smolen, J.S., and Graninger, W.B. (2003). Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum.* *48*, 2501–2508.
- Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., Rojas-Martínez, A., Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., and Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet. Mol. Biol.* *38*, 420–432.

- Brazil, D.P., Church, R.H., Surae, S., Godson, C., and Martin, F. (2015). BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol.* *25*, 249–264.
- Broege, A., Pham, L., Jensen, E.D., Emery, A., Huang, T.-H., Stemig, M., Beppu, H., Petryk, A., O'Connor, M., Mansky, K., et al. (2013). Bone Morphogenetic Proteins Signal Via SMAD and Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Pathways at Distinct Times during Osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* *288*, 37230–37240.
- Calva-Cerqueira, D., Dahdaleh, F.S., Woodfield, G., Chinnathambi, S., Nagy, P.L., Larsen-Haidle, J., Weigel, R.J., and Howe, J.R. (2010). Discovery of the BMPRI1A promoter and germline mutations that cause juvenile polyposis. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 4654–4662.
- Chandrakesan, P., Ahmed, I., Chinthalapally, A., Singh, P., Awasthi, S., Anant, S., and Umar, S. (2012). Distinct compartmentalization of NF- κ B activity in crypt and crypt-denuded lamina propria precedes and accompanies hyperplasia and/or colitis following bacterial infection. *Infect. Immun.* *80*, 753–767.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (2005). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am. J. Anat.* *141*, 537–561.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469–480.
- Clevers, H. (2013). A unifying theory for the crypt. *Nature* *495*, 54–55.
- Colston, K.W., Mackay, A.G., Finlayson, C., Wu, J.C., and Maxwell, J.D. (1994). Localisation of vitamin D receptor in normal human duodenum and in patients with coeliac disease. *Gut* *35*, 1219–1225.
- Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a015081.
- Daum, S., Foss, H., Schuppan, D., Riecken, E., Zeitz, M., and Ullrich, R. (2006). Synthesis of Collagen I in Collagenous Sprue. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 1232–1236.
- Davis, H., Irshad, S., Bansal, M., Rafferty, H., Boitsova, T., Bardella, C., Jaeger, E., Lewis, A., Freeman-Mills, L., Giner, F.C., et al. (2015). Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat. Med.* *21*, 62–70.
- Demitrack, E.S., and Samuelson, L.C. (2016). Notch regulation of gastrointestinal stem cells: Notch regulates GI stem cells. *J. Physiol.* *594*, 4791–4803.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., García, M.P., Sáez, F.J., Aparicio, F., Díaz-Flores, L., and Madrid, J.F. (2014). Uptake and intracytoplasmic storage of pigmented particles by human CD34+ stromal cells/telocytes: endocytic property of telocytes. *J. Cell. Mol. Med.* *18*, 2478–2487.

- Drozdowski, L.A., and Thomson, A.B. (2006). Intestinal sugar transport. *World J. Gastroenterol. WJG* 12, 1657–1670.
- Durand, A., Donahue, B., Peignon, G., Letourneur, F., Cagnard, N., Slomianny, C., Perret, C., Shroyer, N.F., and Romagnolo, B. (2012). Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8965–8970.
- Erlandsen, S.L., Parsons, J.A., and Taylor, T.D. (1974). Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in the Paneth cells of man. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 22, 401–413.
- van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959–963.
- Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 143, 1518–1529.e7.
- Farin, H.F., Jordens, I., Mosa, M.H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D.V.F., de Punder, K., Angers, S., Peters, P.J., Maurice, M.M., et al. (2016). Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* 530, 340–343.
- Farquhar, M.G. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17, 375–412.
- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559.
- Flier, L.G. van der, Gijn, M.E. van, Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D.E., Begthel, H., Born, M. van den, Guryev, V., Oving, I., et al. (2009). Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell* 136, 903–912.
- van der Flier, L.G., Haegebarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 137, 15–17.
- Gámez, B., Rodríguez-Carballo, E., and Ventura, F. (2013). BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation. *Front. Cell. Neurosci.* 7.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2907–2917.

Gericke, B., Amiri, M., and Naim, H.Y. (2016). The multiple roles of sucrase-isomaltase in the intestinal physiology. *Mol. Cell. Pediatr.* 3.

Giannandrea, M., and Parks, W.C. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis. Model. Mech.* 7, 193–203.

Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *Gastroenterology* 129, 626–638.

Greicius, G., Kabiri, Z., Sigmundsson, K., Liang, C., Bunte, R., Singh, M.K., and Virshup, D.M. (2018). PDGFR α pericryptal stromal cells are the critical source of Wnts and RSPO3 for murine intestinal stem cells in vivo Supplementals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E3173–E3181.

Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Izpisua Belmonte, J.C., and Choe, S. (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420, 636–642.

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Sonesson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat. Med.* 21, 1350–1356.

Gunawardene, A.R., Corfe, B.M., and Staton, C.A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int. J. Exp. Pathol.* 92, 219–231.

Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., et al. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* 485, 195–200.

He, T.-C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., Costa, L.T. da, Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* 281, 1509–1512.

He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat. Genet.* 36, 1117–1121.

Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGF β signaling. *Cell Tissue Res.* 347, 21–36.

Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.

Hilkens, J., Timmer, N.C., Boer, M., Ikink, G.J., Schewe, M., Sacchetti, A., Koppens, M.A.J., Song, J.-Y., and Bakker, E.R.M. (2017). RSPO3 expands intestinal stem cell and niche compartments and drives tumorigenesis. *Gut* 66, 1095–1105.

- Howe, J.R., Bair, J.L., Sayed, M.G., Anderson, M.E., Mitros, F.A., Petersen, G.M., Velculescu, V.E., Traverso, G., and Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat. Genet.* *28*, 184–187.
- Huang, Z., Wang, D., Ihida-Stansbury, K., Jones, P.L., and Martin, J.F. (2009). Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 2791–2801.
- Hughes, C.S., Postovit, L.M., and Lajoie, G.A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* *10*, 1886–1890.
- Hynes, R.O. (2009). Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* *326*, 1216–1219.
- Hynes, R.O., and Naba, A. (2012). Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a004903–a004903.
- Iso, T., Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* *194*, 237–255.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 247–269.
- Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, Aliyev, J., Wu, Y., Bunte, R., et al. (2014). Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development* *141*, 2206–2215.
- Kakugawa, S., Langton, P.F., Zebisch, M., Howell, S.A., Chang, T.-H., Liu, Y., Feizi, T., Bineva, G., O'Reilly, N., Snijders, A.P., et al. (2015). Notum deacylates Wnt proteins to suppress signalling activity. *Nature* *519*, 187–192.
- Kangsamaksin, T., Murtomaki, A., Kofler, N.M., Cuervo, H., Chaudhri, R.A., Tattersall, I.W., Rosenstiel, P.E., Shawber, C.J., and Kitajewski, J. (2015). Notch Decoys that Selectively Block Dll/Notch or Jagged/Notch Disrupt Angiogenesis by Unique Mechanisms to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Discov.* *5*, 182–197.
- Katagiri, T., and Watabe, T. (2016). Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*.
- Kelly, C.P., Bai, J.C., Liu, E., and Leffler, D.A. (2015). Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology* *148*, 1175–1186.
- Kim, C.-K., Yang, V.W., and Bialkowska, A.B. (2017). The Role of Intestinal Stem Cells in Epithelial Regeneration Following Radiation-Induced Gut Injury. *Curr. Stem Cell Rep.* *3*, 320–332.

- Kishi, K., Tanaka, T., Igawa, M., Takase, S., and Goda, T. (1999). Sucrase-Isomaltase and Hexose Transporter Gene Expressions Are Coordinately Enhanced by Dietary Fructose in Rat Jejunum. *J. Nutr.* *129*, 953–956.
- Knoop, K.A., Kumar, N., Butler, B.R., Sakthivel, S.K., Taylor, R.T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., and Williams, I.R. (2009). RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 5738–5747.
- Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., Wetering, M. van de, Es, J.H. van, Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., et al. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* *488*, 665–669.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* *137*, 216–233.
- Krausova, M., and Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell. Signal.* *26*, 570–579.
- Lai, C.-F., and Cheng, S.-L. (2002). Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 15514–15522.
- Lamouille, S., and Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* *178*, 437–451.
- de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev.* *28*, 305–316.
- Leow, C.C., Romero, M.S., Ross, S., Polakis, P., and Gao, W.-Q. (2004). Hath1, Down-Regulated in Colon Adenocarcinomas, Inhibits Proliferation and Tumorigenesis of Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* *64*, 6050–6057.
- Luongo, C., Moser, A.R., Gledhill, S., and Dove, W.F. (1994). Loss of Apc⁺ in intestinal adenomas from Min mice. *Cancer Res.* *54*, 5947–5952.
- Mansoor-ul-Haq, and Faisal, N. (2011). Familial adenomatous polyposis. *J. Coll. Physicians Surg.--Pak. JCPSP* *21*, 46–48.
- Mishina, Y., Hanks, M.C., Miura, S., Tallquist, M.D., and Behringer, R.R. (2002). Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis* *32*, 69–72.
- Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E.G., Henderson, D.E., Baffour-Awuah, N.Y., Ambruzs, D.M., Fogli, L.K., Algra, S., et al. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 179–184.

- Morampudi, V., Dalwadi, U., Bhinder, G., Sham, H.P., Gill, S.K., Chan, J., Bergstrom, K.S.B., Huang, T., Ma, C., Jacobson, K., et al. (2016). The goblet cell-derived mediator RELM- β drives spontaneous colitis in Muc2-deficient mice by promoting commensal microbial dysbiosis. *Mucosal Immunol.* 9, 1218–1233.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322–324.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 121–138.
- Mueller, T.D., and Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* 586, 1846–1859.
- Muñoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent ‘+4’ cell markers.’ *EMBO J.* 31, 3079–3091.
- Niehrs, C., and Acebron, S.P. (2012). Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J.* 31, 2705–2713.
- Noah, T.K., Donahue, B., and Shroyer, N.F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* 317, 2702–2710.
- Nunamaker, E.A., Artwohl, J.E., Anderson, R.J., and Fortman, J.D. (2013). Endpoint Refinement for Total Body Irradiation of C57BL/6 Mice. *Comp. Med.* 63, 22–28.
- Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985–999.
- Öberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., and Lendahl, U. (2001). The Notch Intracellular Domain Is Ubiquitinated and Negatively Regulated by the Mammalian Sel-10 Homolog. *J. Biol. Chem.* 276, 35847–35853.
- Ohno, H. (2016). Intestinal M cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 159, 151–160.
- Okajima, T., and Irvine, K.D. (2002). Regulation of Notch Signaling by O-Linked Fucose. *Cell* 111, 893–904.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., and Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401, 480–485.
- Parzanese, I., Qehajaj, D., Patrino, F., Aralica, M., Chiriva-Internati, M., Stifter, S., Elli, L., and Grizzi, F. (2017). Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 8, 27–38.

- Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K.H., Kopan, R., Lewis, J., and Radtke, F. (2011). Dll1- and Dll4-Mediated Notch Signaling Are Required for Homeostasis of Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology* 140, 1230-1240.e7.
- Pieri, L., Vannucchi, M.G., and Fausone-Pellegrini, M.S. (2008). Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1944–1955.
- Pinchuk, I.V., Mifflin, R.C., Saada, J.I., and Powell, D.W. (2010). Intestinal Mesenchymal Cells. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 310–318.
- Poitras, P. (2016). *L'appareil digestif : Des sciences fondamentales à la clinique*. Deuxième édition revue et augmentée (Montréal: Presses de l'Université de Montréal).
- Porter, E.M., Liu, L., Oren, A., Anton, P.A., and Ganz, T. (1997). Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect. Immun.* 65, 2389–2395.
- Posovszky, C., and Wabitsch, M. (2015). Regulation of Appetite, Satiation, and Body Weight by Enteroendocrine Cells. Part 1: Characteristics of Enteroendocrine Cells and Their Capability of Weight Regulation. *Horm. Res. Paediatr.* 83, 1–10.
- Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Washington, M.K., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S.E., et al. (2012). The pan-ErbB negative regulator *Lrig1* is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* 149, 146–158.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., and West, A.B. (1999). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277, C183-201.
- Powell, D.W., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Chen, X., and Mifflin, R.C. (2011). Mesenchymal Cells of the Intestinal Lamina Propria. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 213–237.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.
- Preston, S.L., Wong, W.-M., Chan, A.O.-O., Poulosom, R., Jeffery, R., Goodlad, R.A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W.F., et al. (2003). Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: Origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res.* 63, 3819–3825.
- Propheter, D.C., Chara, A.L., Harris, T.A., Ruhn, K.A., and Hooper, L.V. (2017). Resistin-like molecule β is a bactericidal protein that promotes spatial segregation of the microbiota and the colonic epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 11027–11033.
- Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., et al. (2017). BMP restricts stemness of intestinal *Lgr5*⁺ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat. Commun.* 8, 13824.

- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850.
- Richmond, C.A., Shah, M.S., Carlone, D.L., and Breault, D.T. (2016). Factors regulating quiescent stem cells: insights from the intestine and other self-renewing tissues: Regulation of quiescent stem cells. *J. Physiol.* 594, 4805–4813.
- Roche, K.C., Gracz, A.D., Liu, X.F., Newton, V., Akiyama, H., and Magness, S.T. (2015). SOX9 Maintains Reserve Stem Cells and Preserves Radioresistance in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* 149, 1553-1563.e10.
- Rodríguez-Colman, M.J., Schewe, M., Meerlo, M., Stigter, E., Gerrits, J., Pras-Raves, M., Sacchetti, A., Hornsveld, M., Oost, K.C., Snippert, H.J., et al. (2017). Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* 543, 424–427.
- Roper, J., and Yilmaz, Ö.H. (2017). Metabolic Teamwork in the Stem Cell Niche. *Cell Metab.* 25, 993–994.
- Roulis, M., and Flavell, R.A. (2016). Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation* 92, 116–131.
- Rubio-Tapia, A., Talley, N.J., Gurudu, S.R., Wu, T., and Murray, J.A. (2010). Gluten-Free Diet and Steroid Treatment Are Effective Therapy for Most Patients With Collagenous Sprue. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 344-349.e3.
- Saada, J.I., Pinchuk, I.V., Barrera, C.A., Adegboyega, P.A., Suarez, G., Mifflin, R.C., Di Mari, J.F., Reyes, V.E., and Powell, D.W. (2006). Subepithelial myofibroblasts are novel nonprofessional APCs in the human colonic mucosa. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 5968–5979.
- Sackett, S.D., Fulmer, J.T., Friedman, J.R., and Kaestner, K.H. (2007). Foxl1-Cre BAC transgenic mice: a new tool for gene ablation in the gastrointestinal mesenchyme. *Genes. N. Y. N* 2000 45, 518–522.
- Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., et al. (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* 11, 76–82.
- Samani, A., Zubovits, J., and Plewes, D. (2007). Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. *Phys. Med. Biol.* 52, 1565–1576.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* 40, 915–920.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.

Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.

Schweisguth, F. (2004). Regulation of Notch Signaling Activity. *Curr. Biol.* 14, R129–R138.

Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., et al. (2013). Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell* 152, 25–38.

Shih, I.-M., Wang, T.-L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S.R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 2640–2645.

Shimizu, T., Kayamori, T., Murayama, C., and Miyamoto, A. (2012). Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 suppress granulosa cell apoptosis via different pathways: BMP-4 via PI3K/PDK-1/Akt and BMP-7 via PI3K/PDK-1/PKC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 869–873.

Shoshkes-Carmel, M., Wang, Y.J., Wangenstein, K.J., Tóth, B., Kondo, A., Massasa, E.E., Itzkovitz, S., and Kaestner, K.H. (2018). Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* 557, 242–246.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5522–5527.

Silverman, K.A., Koratkar, R., Siracusa, L.D., and Buchberg, A.M. (2002). Identification of the modifier of Min 2 (Mom2) locus, a new mutation that influences Apc-induced intestinal neoplasia. *Genome Res.* 12, 88–97.

Simons, B.D., and Clevers, H. (2011). Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Exp. Cell Res.* 317, 2719–2724.

Sodir, N.M., Chen, X., Park, R., Nickel, A.E., Conti, P.S., Moats, R., Bading, J.R., Shibata, D., and Laird, P.W. (2006). Smad3 Deficiency Promotes Tumorigenesis in the Distal Colon of *Apc^{Min/+}* Mice. *Cancer Res.* 66, 8430–8438.

Stanger, B.Z., Datar, R., Murtaugh, L.C., and Melton, D.A. (2005). Direct regulation of intestinal fate by Notch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12443–12448.

Stojanova, Z.P., Kwan, T., and Segil, N. (2015). Epigenetic regulation of *Atoh1* guides hair cell development in the mammalian cochlea. *Development* 142, 3529–3536.

Stzpourginski, I., Nigro, G., Jacob, J.-M., Dulauroy, S., Sansonetti, P.J., Eberl, G., and Peduto, L. (2017). CD34⁺ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E506–E513.

Sureban, S.M., May, R., Qu, D., Chandrakesan, P., Weygant, N., Ali, N., Lightfoot, S.A., Ding, K., Umar, S., Schlosser, M.J., et al. (2015). Dietary Pectin Increases Intestinal Crypt Stem Cell Survival following Radiation Injury. *PLOS ONE* *10*, e0135561.

Takahashi-Yanaga, F., and Sasaguri, T. (2008). GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. *Cell. Signal.* *20*, 581–589.

Tan, S., and Barker, N. (2015). Epithelial stem cells and intestinal cancer. *Semin. Cancer Biol.* *32*, 40–53.

Thériault, B.L., Shepherd, T.G., Mujoomdar, M.L., and Nachtigal, M.W. (2007). BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* *28*, 1153–1162.

Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D., and de Sauvage, F.J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* *478*, 255–259.

Toyoda, H., Ina, K., Kitamura, H., Tsuda, T., and Shimada, T. (1997). Organization of the Lamina propria mucosae of Rat Intestinal Mucosa, with Special Reference to the Subepithelial Connective Tissue. *Cells Tissues Organs* *158*, 172–184.

Traber, P.G., Yu, L., Wu, G.D., and Judge, T.A. (1992). Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *262*, G123–G130.

Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A., and Warman, M.L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques* *29*, 52, 54.

Tsai, Y.-H., VanDussen, K.L., Sawey, E.T., Wade, A.W., Kasper, C., Rakshit, S., Bhatt, R.G., Stoeck, A., Maillard, I., Crawford, H.C., et al. (2014). ADAM10 regulates Notch function in intestinal stem cells of mice. *Gastroenterology* *147*, 822-834.e13.

Tsuchiya, K., Nakamura, T., Okamoto, R., Kanai, T., and Watanabe, M. (2007). Reciprocal targeting of Hath1 and beta-catenin by Wnt glycogen synthase kinase 3beta in human colon cancer. *Gastroenterology* *132*, 208–220.

Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* *150*, 893–899.

Vadlakonda, L., Pasupuleti, M., and Pallu, R. (2013). Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells. *Front. Oncol.* *3*.

- VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, Å., et al. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 488–497.
- Vannucchi, M.-G., Traini, C., Manetti, M., Ibba-Manneschi, L., and Faussone-Pellegrini, M.-S. (2013). Telocytes express PDGFR α in the human gastrointestinal tract. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 1099–1108.
- Vannucci, L. (2015). Stroma as an Active Player in the Development of the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* *8*, 159–166.
- Wambach, J., and Barnard, J. (1999). SMAD4 germline mutations in juvenile polyposis coli. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *28*, 538–539.
- Wang, R.N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., et al. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* *1*, 87–105.
- Wei, B., Zhou, X., Liang, C., Zheng, X., Lei, P., Fang, J., Han, X., Wang, L., Qi, C., and Wei, H. (2017). Human colorectal cancer progression correlates with LOX-induced ECM stiffening. *Int. J. Biol. Sci.* *13*, 1450–1457.
- Westbury, C.B., and Yarnold, J.R. (2012). Radiation Fibrosis — Current Clinical and Therapeutic Perspectives. *Clin. Oncol.* *24*, 657–672.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., et al. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* *111*, 241–250.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* *214*, 199–210.
- Yamada, Y., Hata, K., Hirose, Y., Hara, A., Sugie, S., Kuno, T., Yoshimi, N., Tanaka, T., and Mori, H. (2002). Microadenomatous Lesions Involving Loss of Apc Heterozygosity in the Colon of Adult ApcMin/2 Mice. *5*.
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H., and Matsumoto, K. (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.* *18*, 179–187.
- Yang, Q. (2001). Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science* *294*, 2155–2158.
- Yeung, T.M., Chia, L.A., Kosinski, C.M., and Kuo, C.J. (2011). Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 2513–2523.

Young, M., Ordonez, L., and Clarke, A.R. (2013). What are the best routes to effectively model human colorectal cancer? *Mol. Oncol.* 7, 178–189.

Zeineldin, M., and Neufeld, K.L. (2013). More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1836, 80–89.

Zhao, X., and Johnson, R.L. (2011). A Rare, Severe Small-Bowel Malabsorptive Disorder. *Arch Pathol Lab Med* 135, 7.

Zhao, H., Ayrault, O., Zindy, F., Kim, J.-H., and Roussel, M.F. (2008). Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes Dev.* 22, 722–727.

Zheng, X., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Iwasaki, M., Kano, Y., Sakamoto, N., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2011). Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 2251–2260.

9. ANNEXES

Annexe 1 – Licence pour la figure 1

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 04, 2018

This Agreement between University of Sherbrooke -- Raphaëlle Servant ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4381930601040
License date	Jul 04, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Seminars in Cancer Biology
Licensed Content Title	Epithelial stem cells and intestinal cancer
Licensed Content Author	Shawna Tan,Nick Barker
Licensed Content Date	Jun 1, 2015
Licensed Content Volume	32
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	14
Start Page	40
End Page	53
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Original figure numbers	Figure 2
Title of your thesis/dissertation	mesenchymal Bmp signaling in the
Expected completion date	Sep 2018
Estimated size (number of pages)	130
Requestor Location	University of Sherbrooke 3201 rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: University of Sherbrooke
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD

Annexe 2 – Licence pour les figures 2 et 10

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 23, 2018

This Agreement between University of Sherbrooke -- Raphaëlle Servant ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4374841212787
License date	Jun 23, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Physiology
Licensed Content Title	Notch regulation of gastrointestinal stem cells
Licensed Content Author	Elise S. Demitrack,Linda C. Samuelson
Licensed Content Date	Jun 26, 2016
Licensed Content Pages	13
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1 and figure 4
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	mesenchymal Bmp signaling in the
Expected completion date	Sep 2018
Expected size (number of pages)	130
Requestor Location	University of Sherbrooke 3201 rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: University of Sherbrooke
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work

Annexe 3 – Licence pour la figure 3

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 25, 2018

This Agreement between University of Sherbrooke -- Raphaëlle Servant ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4376081387480
License date	Jun 25, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Molecular Cell Biology
Licensed Content Title	Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration
Licensed Content Author	Nick Barker
Licensed Content Date	Dec 11, 2013
Licensed Content Volume	15
Licensed Content Issue	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	mesenchymal Bmp signaling in the
Instructor name	n/a
Institution name	n/a
Expected presentation date	Sep 2018
Portions	Figure 2
Requestor Location	University of Sherbrooke 3201 rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: University of Sherbrooke
Billing Type	Invoice

Annexe 4 – Licence pour la figure 4

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 25, 2018

This Agreement between University of Sherbrooke -- Raphaëlle Servant ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4376071198624
License date	Jun 25, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Gastroenterology
Licensed Content Title	SOX9 Maintains Reserve Stem Cells and Preserves Radioresistance in Mouse Small Intestine
Licensed Content Author	Kyle C. Roche, Adam D. Gracz, Xiao Fu Liu, Victoria Newton, Haruhiko Akiyama, Scott T. Magness
Licensed Content Date	Nov 1, 2015
Licensed Content Volume	149
Licensed Content Issue	6
Licensed Content Pages	21
Start Page	1553
End Page	1563.e10
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Original figure numbers	Figure 7
Title of your thesis/dissertation	mesenchymal Bmp signaling in the
Expected completion date	Sep 2018
Estimated size (number of pages)	130
Requestor Location	University of Sherbrooke 3201 rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada

Annexe 5 – Licence pour la figure 5

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 25, 2018

This Agreement between University of Sherbrooke -- Raphaëlle Servant ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4375991468676
License date	Jun 25, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Differentiation
Licensed Content Title	Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease
Licensed Content Author	Manolis Roulis, Richard A. Flavell
Licensed Content Date	Sep 1, 2016
Licensed Content Volume	92
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	16
Start Page	116
End Page	131
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Original figure numbers	Figure 2
Title of your thesis/dissertation	mesenchymal Bmp signaling in the
Expected completion date	Sep 2018
Estimated size (number of pages)	130
Requestor Location	University of Sherbrooke 3201 rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: University of Sherbrooke
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12

Annexe 6 – Licence pour la figure 9

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 21, 2018

This Agreement between University of Sherbrooke -- Raphaëlle Servant ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4373820420985
License date	Jun 21, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell
Licensed Content Title	Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities
Licensed Content Author	Roel Nusse, Hans Clevers
Licensed Content Date	Jun 1, 2017
Licensed Content Volume	169
Licensed Content Issue	6
Licensed Content Pages	15
Start Page	985
End Page	999
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Original figure numbers	Figure 4
Title of your thesis/dissertation	mesenchymal Bmp signaling in the
Expected completion date	Sep 2018
Estimated size (number of pages)	130
Requestor Location	University of Sherbrooke 3201 rue Jean Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: University of Sherbrooke
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12