

Université de Sherbrooke

**HDAC1 et HDAC2, des rôles redondants et distincts dans la régulation de
l'homéostasie intestinale**

Par
Alexis Gonneaud
Programmes de Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en Biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
21 Septembre 2017

Membres du jury d'évaluation

Claude Asselin, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
François Boudreau, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Steve Jean, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
Pedro-Miguel Geraldès, Département de médecine - Service d'endocrinologie
Jacques J. Tremblay, Département d'obstétrique, gynécologie et reproduction, Faculté de
médecine, Université Laval

© Gonneaud Alexis, 2017

A Aurélie qui est là au quotidien et qui partage ma vie

A ma famille qui est toujours présente malgré la distance

*A mes boss et leur labo pour leur accueil, la bonne
ambiance et l'envie de faire de la science*

**« TOUT OBSTACLE RENFORCE LA DÉTERMINATION.
CELUI QUI S'EST FIXÉ UN BUT N'EN CHANGE PAS. »**

LÉONARD DE VINCI (1452 - 1519)

Résumé

HDAC1 et HDAC2, des rôles redondants et distincts dans la régulation de l'homéostasie intestinale

Par

Alexis Gonneaud

Programmes de Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les histones désacétylases HDAC1 et HDAC2 catalysent le retrait d'un groupement acétyle de résidus lysine, dans des protéines histones et non-histones. Les HDAC contrôlent la prolifération, la mort et la différenciation cellulaire. Des propriétés anti-inflammatoires et anti-tumorales ont été attribuées à des inhibiteurs contre les HDAC (HDACi), notamment dans les cellules épithéliales intestinales (CEI). Nous supposons que différents niveaux de HDAC1 ou HDAC2 dans les CEI induisent différentes réponses dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Nous avons donc généré des souris hétérozygotes avec un seul allèle de *Hdac1* ou *Hdac2* dans le contexte de la délétion de l'autre. Les résultats indiquent que les souris *Hdac1*^{-/-};*Hdac2*^{+/-} Villine-Cre présentent un phénotype similaire à celui d'un double mutant, à savoir des défauts d'architecture dans le jéjunum et le côlon, de la dysplasie et hyperplasie, une réduction du nombre de cellules à mucus, mais sans modification du nombre de cellules de Paneth et de la perméabilité épithéliale. Un allèle de *Hdac2* n'est donc pas suffisant pour maintenir une homéostasie normale en l'absence de *Hdac1*. Nous avons aussi vérifié l'effet de la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* à l'âge adulte dans le modèle inductible AhCre. Dans ce contexte, la perte de *Hdac1* et *Hdac2* entraîne une mortalité accrue après 8 jours, avec un arrêt de prolifération et l'induction de dommages à l'ADN. Nous avons alors exploré l'impact moléculaire de la perte des deux *Hdac* dans les CEI par une approche protéomique et transcriptomique. Nous avons observé des changements notables dans plusieurs voies de signalisation, associées à la prolifération, à des mécanismes de stress, au métabolisme, surtout lipidique. Ces changements sont en partie régulés post-traductionnellement. Bien que très instructifs, les modèles *in vivo* ne permettent pas de déterminer si les modifications de l'expression des gènes observées sans *Hdac1* et/ou *Hdac2* sont intrinsèques aux CEI ou si ces changements dépendent de signaux extrinsèques de la muqueuse ou de la lumière intestinale. Nous avons donc établi des cultures d'entéroïdes à partir de la crypte intestinale, ce qui permet la croissance, l'expansion et la différenciation des CEI progénitrices, sans l'influence de l'environnement. Nous avons entrepris des analyses protéomiques de type SILAC, suite à une inhibition pharmacologique des HDAC de type I, le CI994, ou suite à une délétion génétique de *Hdac1* ou *Hdac2*. L'inhibition pharmacologique entraîne un arrêt de prolifération associé à une différenciation altérée en faveur des cellules absorbantes, rappelant le modèle murin sans *Hdac1* et *Hdac2*. Les voies liées à la réplication de l'ADN et au cycle cellulaire sont diminuées. Même si la perte de *Hdac1* ou *Hdac2* n'affecte pas notablement la croissance et la différenciation des entéroïdes, des voies associées au métabolisme et aux réponses à l'environnement sont augmentées. Au contraire, des entéroïdes sans *Hdac1* et *Hdac2* ne croissent pas en culture et dégèrent en moins de 3 jours. Ceci suggère que l'environnement mucosal pourrait soutenir les CEI *Hdac1*^{-/-};*Hdac2*^{-/-} de la niche épithéliale *in vivo*. Nos données suggèrent que des variations intrinsèques ou extrinsèques de l'activité de HDAC1 et HDAC2 modifient la réponse des CEI à l'environnement et entraînent des perturbations de l'homéostasie intestinale.

Mots clé : HDAC1, HDAC2, épithélium intestinal, entéroïde, protéomique, transcriptomique.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------------|
| I. Résumé | IV |
| II. Table des matières | V |
| III. Liste des figures | VII |
| IV. Liste des tableaux | IX |
| V. Liste des abréviations | X |
| 1. Introduction | 14 |
| 1.1. L'intestin: une relation étroite entre l'épithélium et l'environnement | 14 |
| 1.1.1. La lamina propria | 14 |
| 1.1.2. L'épithélium intestinal | 14 |
| 1.1.3. La niche épithéliale au cœur du maintien de l'homéostasie | 18 |
| 1.1.4. Les maladies inflammatoires intestinales | 22 |
| 1.2. Noyau, ADN, chromatine et épigénétique | 25 |
| 1.2.1. Chromatine et épigénétique: organisation et remodelage | 25 |
| 1.2.2. L'acétylation et l'acétyl-CoA: un métabolite à la croisée des chemins | 28 |
| 1.2.3. La famille des HDAC: distribution, fonctions et pathologies | 29 |
| 1.2.4. HDAC1 et HDAC2: redondances et spécificités | 32 |
| 1.2.5. Les inhibiteurs de HDAC: avancées et développement | 35 |
| 1.3. HDAC1 et HDAC2 au cœur du développement de l'épithélium intestinal | 38 |
| 1.3.1. HDAC1 et HDAC2 participent au maintien de l'homéostasie intestinale | 38 |
| 1.3.2. HDAC1 et HDAC2 induisent des réponses inflammatoires distinctes | 39 |
| 1.3.3. HDAC1 et HDAC2 peuvent modifier le fonctionnement de l'épithélium en dérégularisant les voies métaboliques | 40 |
| 1.4. Étude des fonctions intrinsèques des CEI par la culture d'organoïdes | 40 |
| 1.5. Hypothèse de recherche | 41 |

| | |
|--|------------|
| 2. CHAPITRE 1 Distinct roles for Intestinal Epithelial Cell-Specific Hdac1 and Hdac2 in the Regulation of Murine Intestinal Homeostasis | 44 |
| 3. CHAPITRE 2 HDAC1 et HDAC2 affectent le développement de l'épithélium intestinal en perturbant les voies de synthèse protéique, métabolique et de défense | 85 |
| 3.1. Matériel et méthodes | 85 |
| 3.1.1. Marquage des protéines au TMT et spectrométrie de masse | 85 |
| 3.1.2. Séquençage des ADNc | 86 |
| 3.1.3. Analyse bio-informatique | 87 |
| 3.2. Résultats | 87 |
| 4. CHAPITRE 3 A SILAC-Based Method for Quantitative Proteomic Analysis of Intestinal Organoids | 98 |
| 5. CHAPITRE 4 HDAC1 et HDAC2 dérégulent les processus métaboliques et de défense dans les organoïdes | 115 |
| 5.1. Matériel et méthodes | 115 |
| 5.1.1. Culture d'organoïdes dans le milieu SILAC et spectrométrie de masse | 115 |
| 5.1.2. Extraction des protéines et immunobuvardage | 116 |
| 5.1.3. RT-PCR semi-quantitative | 117 |
| 5.1.4. Analyse bio-informatique | 117 |
| 5.2. Résultats | 118 |
| 6. Discussion | 127 |
| 6.1. HDAC1 et HDAC2 CEI-spécifiques ont des rôles similaires et distincts dans le contrôle de l'homéostasie intestinale | 127 |
| 6.2. L'environnement de la muqueuse semble important dans le maintien des CEI sans <i>Hdac1</i> et <i>Hdac2</i> | 132 |
| 6.3. HDAC1 et HDAC2 ont des cibles similaires et complémentaires intrinsèques aux CEI | 138 |
| 7. Conclusion | 145 |
| 8. Remerciements | 146 |
| 9. Liste des références | 147 |
| 10. Annexes | 166 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 Organisation de l'épithélium intestinal proximal. | 16 |
| Figure 2 Régulation de l'autorenouvellement des ISC dans la niche. A. Voies de signalisation régulant les ISC. | 20 |
| Figure 3 Les études d'association pangénomique ont identifié des voies de signalisation et des types cellulaires associés aux MII. | 23 |
| Figure 4 La régulation épigénétique est un processus dynamique. | 27 |
| Figure 5 L'inhibition des HDAC par des HDACi affectent de nombreux processus cellulaires. | 36 |
| Figure 6 Supplementary Figure 1. Conditional intestinal epithelial <i>Hdac1</i> deletion does not alter significantly intestinal homeostasis | 53 |
| Figure 7 Supplementary Figure 2. Conditional intestinal epithelial <i>Hdac1</i> deletion does not alter significantly intestinal homeostasis | 54 |
| Figure 8 Supplementary Figure 3. Mice with one allele of IEC <i>Hdac2</i> display increased colon and small intestine length. | 56 |
| Figure 9 Figure 1. One allele of IEC-specific <i>Hdac2</i> is insufficient to maintain normal intestinal architecture. | 58 |
| Figure 10 Supplementary Figure 4. Microscopic analysis of dual <i>Hdac1</i> ^{-/-} <i>Hdac2</i> ^{-/-} jejunal cells. | 60 |
| Figure 11 Supplementary Figure 5. Microscopic analysis of dual <i>Hdac1</i> ^{-/-} <i>Hdac2</i> ^{+/-} jejunal cells. | 61 |
| Figure 12 Figure 2. IEC proliferation and migration are differently regulated in mice with one allele of <i>Hdac1</i> or <i>Hdac2</i> | 61 |
| Figure 13 Figure 3. One allele of IEC-specific <i>Hdac2</i> is insufficient to maintain proper goblet cell determination. | 63 |
| Figure 14 Figure 4. One allele of IEC-specific <i>Hdac2</i> or <i>Hdac1</i> is sufficient to maintain proper Paneth cell determination | 66 |
| Figure 15 Figure 5. Mice with one allele of IEC-specific <i>Hdac2</i> exhibit increased immune cell recruitment. | 66 |
| Figure 16 Supplementary Figure 6. Mice with one allele of IEC-specific <i>Hdac2</i> exhibit increased fibrosis. | 69 |
| Figure 17 Figure 6. Different basal and DSS-induced responses are observed in single <i>Hdac1</i> and <i>Hdac2</i> IEC-specific mutant mice. | 72 |
| Figure 18 Figure 7. <i>Ah</i> -Cre-dependent <i>Hdac1</i> and <i>Hdac2</i> deletion in adult mice leads to intestinal epithelial erosion and a DNA damage response. | 74 |
| Figure 19 Supplementary Figure 7. <i>Ah</i> -Cre-dependent <i>Hdac1</i> and <i>Hdac2</i> deletion in adult mice leads to gastric defects. | 75 |
| Figure 20 Figure 8. <i>Villin</i> -Cre ^{ER} -dependent <i>Hdac1</i> and <i>Hdac2</i> deletion in adult mice leads to intestinal epithelial defects similar to dual <i>villin</i> -Cre-mediated knockout mice. | 77 |
| Figure 21 Supplementary Figure 8. γ -H2AX foci are increased in <i>villin</i> -Cre <i>Hdac1</i> and <i>Hdac2</i> IEC-specific mutant mice. | 79 |

| | |
|---|------------|
| Figure 22 Supplementary Figure 9. Jejunal <i>villin-Cre^{ER}</i> <i>Hdac1</i> and <i>Hdac2</i> IEC-specific mutant still display patchy <i>Hdac2</i> expression. | 82 |
| Figure 23 Analyse transcriptomique et protéomique réalisée sur des CEI <i>Hdac1/2^{-/-}</i> isolées de jéjunum murin (Sheynkman <i>et al.</i>, 2014) | 89 |
| Figure 24 La perte de HDAC1 et HDAC2 dans les CEI entraîne modifications similaires et différentes de la régulation des gènes et des protéines. | 91 |
| Figure 25 Figure 1 - Experimental protocol of SILAC labelling of organoids and mass spectroscopy analysis. | 102 |
| Figure 26 Figure 2 - Incorporation of SILAC isotopes in organoid cultures and effect of the class I HDAC inhibitor CI994 on organoid growth and development. | 105 |
| Figure 27 Figure 3 - CI994 treatment affects organoid differentiation and development processes. | 107 |
| Figure 28 Les organoïdes ne peuvent pas se développer sans <i>Hdac1</i> et <i>Hdac2</i>. | 119 |
| Figure 29 Les niveaux d'ARN et de protéines de HDAC1 et de HDAC2 sont réduits dans les organoïdes obtenus de jéjunum de souris Villine-Cre correspondantes. | 120 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 Principales fonctions associées aux différents HDAC dans l'organisme. | 31 |
| Tableau 2 La perte de <i>Hdac1</i> et <i>Hdac2</i> dans les CEI affecte les processus métaboliques, de différenciation, les mécanismes de défense et de régulation épigénétique. | 92 |
| Tableau 3 La perte de <i>Hdac1</i> et <i>Hdac2</i> dans les CEI induit des altérations dans les fonctions prolifératives et productrices d'énergie des CEI. | 95 |
| Tableau 4 Régulateurs activés ou réprimés suite à la perte de <i>Hdac1</i> et <i>Hdac2</i> dans les CEI. | 96 |
| Tableau 5 La perte de <i>Hdac1</i> dans les organoïdes affecte des cibles associées au métabolisme et à des mécanismes épigénétiques. | 122 |
| Tableau 6 Analyse des régulateurs prédits pour être activés ou réprimés suite à la perte de <i>Hdac1</i> dans les organoïdes. | 123 |
| Tableau 7 La perte de <i>Hdac2</i> dans les organoïdes affecte des cibles associées à la gestion du stress oxydatif, la réponse aux xénobiotiques et au métabolisme lipidique. | 124 |
| Tableau 8 Analyse des régulateurs prédits pour être activés ou réprimés suite à la perte de <i>Hdac2</i> dans les organoïdes. | 125 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C: degré Celsius
µg: microgramme
µl: microlitre
µM: micromolaire
aa: acide aminé
Ac: acétyle
Ac-CoA: acétyl-coenzyme A
ACL: ATP-citrate lyase
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: ADN complémentaire
APC: adenomatous polyposis coli protein
APS: *ammonium persulfate*
ARN: acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ATP: adénosine-5'-triphosphate
BCA: acide bicinchonique
BMP: bone morphogenetic protein
BrdU: bromodésoxyuridine
BSA: albumine sérique bovine
C/EBP: *CCAAT enhancer-binding protein*
CBP/P300: *CREB-binding protein / Histone acetyltransferase p300*
Ccl: *chemokine (C-C motif) ligand*
CKDN1A: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21)*
CKDN1B: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)*
CO₂: dioxyde de carbone
CoREST: *co-repressor for RE1 silencing transcription factor*
Ctrl: contrôle
Cxcl: *chemokine (C-X-C motif) ligand*
Da: Dalton
DBZ: dérivé de la benzodiazépine inhibitant la gamma-sécrétase
DMSO: *diméthylsulfoxyde*
DSS: *dextran sodium sulfate*
DTT: dithiothréitol
EDTA: disodium éthylènediamine tétraacétate
EGF: *epidermal growth factor*
Era: récepteur des oestrogènes, alpha
FDR: *false discovery rate*
FITC: fluorescéine isothiocyanate
FOXO: *forkhead box protein O*
FXR: *farnesoid X-activated receptor*
g: force centrifuge relative
GAPDH: glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GFP: *green fluorescent protein*

γ H2AX : gamma H2A.X (phospho S139)
GIP: peptide insulinothrique dépendant du glucose
GLP-1: *glucagon-like peptide-1*
GR: récepteur aux glucocorticoïdes
GWAS : étude d'association à l'échelle du génome
h: heure
H2A: histone 2A
H2B: histone 2B
H3: histone 3
H4: histone 4
HAT: histone acétyltransférase
HDAC: histone désacétylase
HDACi: inhibiteur des histones désacétylases
HNF4 α : *hepatocyte nuclear factor 4, alpha*
Hp: haptoglobine
HRP: *horseradish peroxydase*
IEC-6: cellules épithéliales intestinales de crypte de rat
IgA: immunoglobulines A
IGF : facteur de croissance insulino-like
IgG: immunoglobuline G / Immunoglobulin G
IKK: kinase de l'inhibiteur de NF- κ B
IL: interleukine
IL6 : interleukine 6
IL22 : interleukine 22
IPA : logiciel Ingenuity Pathway Analysis
I κ B: inhibiteur de NF- κ B
JAK : kinase Janus
JmJc KDM: *JmJc domain-containing histone demethylase*
K: lysine
kDa: kilodalton
LDH: lactate déhydrogénase
LXR: *Liver X receptor*
L Th: lymphocytes T auxiliaires
L Treg : lymphocytes T régulateurs
M: molaire
MAPK: *mitogen activated protein kinase*
MBD3: *methyl-CpG-binding domain protein 3*
me: méthyl
mg: milligramme
MII: maladies inflammatoires intestinales
min: minute
mL: millilitre
mm: millimètre
mM: millimolaire
MS-275: entinostat
Sin3a: *switch-independent 3 protein a*

mTOR: cible de la rapamycine chez les mammifères
NaBu: butyrate de sodium
NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
NCOA: *Nuclear receptor coactivator*
NCOR : *nuclear receptor co-repressor*
NES: séquence d'exportation nucléaire
NF-κB: facteur nucléaire κB
ng: nanogramme
NLR: récepteurs de type Nod
NLS: séquence de localisation nucléaire
nm: nanomètre
NOD2: *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*
NP-40: nonidet P-40
N-terminal: domaine amino-terminal
NuRD: *nucleosome remodelling and deacetylation*
PAMP: patrons moléculaires associés aux pathogènes
pb: paire de bases
Pbgd: porphobilinogen désaminase
PBS: tampon phosphate salin
PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*
PCR: réaction de polymérase en chaîne
PDH: pyruvate déshydrogénase
PGC1α: *peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator 1α*
PHD: homéodomaine de plante
PK: pyruvate kinase
PLA2G2a : phospholipase A2 Groupe IIA
pmole: picomole
PYY: peptide tyrosine tyrosine
qPCR: réaction de polymérase en chaîne quantitative
RIN: *RNA Integrity Number*
RXR: *Retinoid acid receptor*
S6K1: protéine ribosomale S6 kinase 1
SAHA: acide suberoylanilide hydroxamique
SDS: dodécyl sulfate de sodium
SEM: erreur standard de la moyenne
Ser: sérine
SILAC: *Stable Isotope Labelling of Amino acid in Culture*
Sir2: *yeast silent information regulator 2*
SIRT: *sirtuin*
SMAD: *mothers against decapentaplegic homolog*
SMRT: *nuclear receptor corepressor 2*
STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*
SWI/SNF: *switch/sucrose non fermentable*
TEAB: triéthylammonium bicarbonate
TBP: *TATA-binding protein*
TBS: tampon tris salin

TCEP: tris (2-carboxyethyl)phosphine
TEMED: tétraméthyléthylènediamine
TGF β : facteur de croissance transformant, beta
TLR: récepteurs de type Toll
TNF- α : facteur de nécrose tumorale
Tris: tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TSA: trichostatin A
U: unité
VPA: acide valproïque
ZO-1: *Zona occludens protein*

1. Introduction

1.1. L'intestin: une relation étroite entre l'épithélium et l'environnement

L'appareil digestif comprend l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le côlon. Cet ensemble d'organes assure la propagation, la mixtion, la digestion et l'absorption du bol alimentaire. Le tractus intestinal, issu de l'endoderme, est le plus grand organe immunitaire et endocrinien du corps et le deuxième organe sensoriel, en plus d'être essentiel dans tous les processus d'échange avec le milieu. Il présente, chez l'homme, une surface d'échange d'environ 300 m². L'intestin est formé par un ensemble de structures dont la *lamina propria* qui supporte l'épithélium intestinal, qui lui-même englobe la lumière intestinale contenant le bol alimentaire et le microbiote. Le tout est entouré par une couche musculaire assurant la propagation du bol alimentaire et la mixtion.

1.1.1. La lamina propria

La *lamina propria* contient différents types cellulaires ainsi que les réseaux sanguins, nerveux et lymphatique. Par exemple, les cellules stromales (myofibroblastes) sont généralement réparties autour des cryptes épithéliales, et sécrètent des éléments essentiels au maintien de la niche épithéliale, tels que des facteurs WNT ou des inhibiteurs des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) (Noggin) (Sailaja *et al.*, 2016). Le système immunitaire comprend des lymphocytes B produisant des immunoglobulines, des lymphocytes T à activité pro- (Th17) ou anti-inflammatoire (Treg), des neutrophiles, des macrophages (M1 ou M2) ou encore des cellules dendritiques (Asselin et Gendron, 2014). Certaines de ces cellules sont localisées entre les cellules épithéliales intestinales, notamment les lymphocytes intraépithéliaux. Associées aux follicules lymphoïdes isolés, les plaques de Peyer, qui forment le tissu lymphoïde, testent la microflore intestinale (Renz *et al.*, 2011).

1.1.2. L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est formé par une monocouche de cellules épithéliales qui assure des fonctions diverses, notamment en formant une barrière entre le bol alimentaire et le microbiote contenu dans la lumière intestinale, et la muqueuse sous-jacente (Turner, 2009). L'architecture de l'épithélium varie entre le duodénum et le côlon. Au niveau du duodénum, l'épithélium est orienté selon un axe crypte-villosité,

structure conservée jusqu'à l'iléon avec un raccourcissement progressif de la longueur des villosités. Dans le côlon, il y a un changement de morphologie avec l'adoption d'un axe crypte-épithélium de surface. Ces changements structurels accompagnent les différentes fonctions de chacun des segments de l'intestin (Abreu, 2010).

Dans l'intestin proximal, le duodénum est rempli d'enzymes digestives qui décomposent les aliments provenant de l'estomac. Les nombreuses villosités dans ce segment jusqu'à l'iléon favorisent l'absorption des nutriments. L'iléon présente aussi des fonctions d'absorption des sels biliaires, importants dans le métabolisme lipidique, et de certaines vitamines. Le côlon absorbe principalement de l'eau, et c'est à cet endroit que l'on retrouve la plus grande concentration de microbes.

D'un point de vue cellulaire, les cryptes contiennent les cellules souches pluripotentes prolifératives qui maintiennent le renouvellement des cellules épithéliales. Plusieurs types de cellules souches caractérisées par des marqueurs et des rôles spécifiques ont été identifiées (Munoz *et al.*, 2012). Les cellules souches produisent des cellules filles ou progénitrices qui vont se déterminer dans la zone d'amplification transitoire tout en remontant le long de la crypte. Ces cellules progénitrices se divisent encore plusieurs fois, tout en se différenciant. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le développement de l'épithélium intestinal. La voie de Notch affecte l'homéostasie intestinale en régulant les cellules souches de la colonne de base de cryptes et en favorisant le devenir des cellules absorbantes. La signalisation de Notch contrôle le destin des cellules souches intestinales en régularisant l'expression de gènes *Hes* et en réprimant *ATOH1*, ce qui favorise la différenciation en cellules absorbantes par rapport aux lignées sécrétoires (Zheng *et al.*, 2011). La niche intestinale se compose également de gradients spatiaux de facteur de croissance WNT et épithélial (EGF), tandis que les signaux de protéine morphogénétique osseuse (BMP/TGF- β) sont inhibés, comme nous le verrons plus bas (Sato *et al.*, 2009). La plupart des cellules différenciées migrent le long de l'axe crypte-villosité avant de desquamer au sommet des villosités (Parker *et al.*, 2017). L'épithélium intestinal se renouvelle à tous les 5 à 7 jours chez l'homme, ce qui fait de l'intestin, l'un des organes les plus prolifératifs (Figure 1).

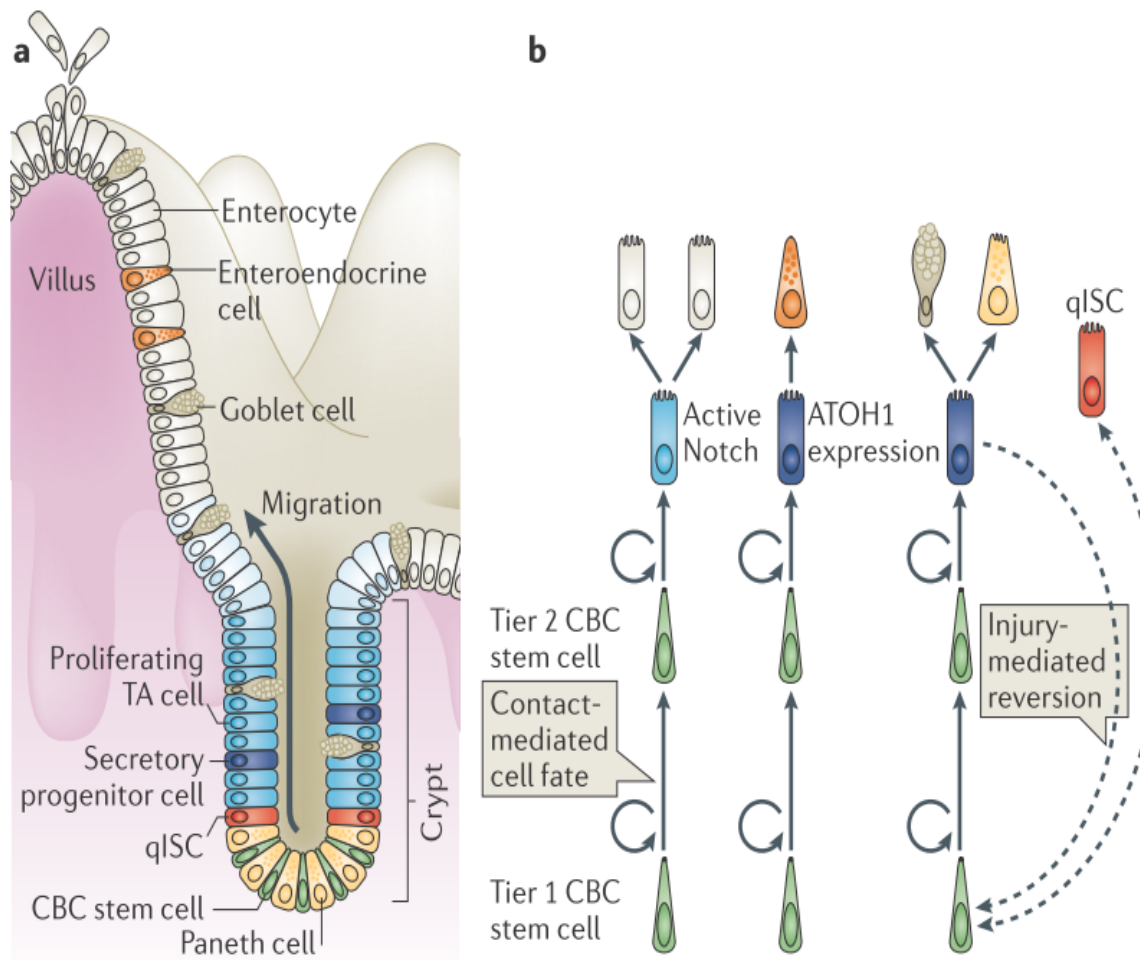


Figure 1 Organisation de l'épithélium intestinal proximal. **A.** Les cellules souches intestinales (ISC) résident près de la base de la crypte et produisent des cellules progénitrices (cellules d'amplification transitoire (TA)), qui prolifèrent dans la crypte moyenne et se différencient finalement pour produire les différents types cellulaires. Les cellules souches de la colonne de base de cryptes (CBC) sont flanquées par les cellules de Paneth à la base de la crypte. Les cellules différenciées qui forment la villosité comprennent les entérocytes absorbants, les cellules à mucus et les cellules entéroendocrines. Les ISC en position +4 (qISC) résident juste au-dessus de la zone qui contient des cellules de Paneth et les cellules CBC. **B.** Les cellules CBC participent au maintien de la niche et la zone TA participe à la différenciation, en utilisant une signalisation dépendant de la voie Notch pour déterminer le devenir en cellules absorbantes. Dans l'autre voie importante, l'expression du facteur de transcription homologue atonal 1 (ATOH1) entraîne l'engagement vers la lignée sécrétoire, comprenant les cellules à mucus, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. Lors de stress extrêmes qui provoquent l'épuisement du pool de cellules CBC, la réversion des cellules progénitrices peut être engagée, ce qui

entraîne un retour à l'état de cellules souches (flèche pointillée). Les +4 ISC peuvent redonner des cellules CBC après une blessure (radiation) (Tirée de (Goodell *et al.*, 2015))(Numéro de licence 4174260283902).

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) différenciées ont chacune des propriétés spécifiques. La majorité des CEI sont les cellules absorbantes, aussi appelées entérocytes ou colonocytes, avec comme fonction principale une participation dans la digestion et l'absorption des nutriments. En effet, les entérocytes présentent sur leur pôle apical de nombreuses microvillosités qui contribuent à augmenter la surface d'absorption pour les nutriments et pour d'autres molécules trouvées dans la lumière intestinale, comme les peptides, les vitamines, l'eau et les électrolytes. Ces cellules peuvent aussi produire de façon constitutive ou en réponse à des infections/inflammation, des protéines qui peuvent contrôler le microbiote, ou servir de signaux vers les autres cellules de la muqueuse, notamment les cellules immunitaires (Miron et Cristea, 2012).

Les cellules à mucus, ou caliciformes, ont pour fonction principale la sécrétion d'un mucus protecteur qui protège l'épithélium, en empêchant un contact direct avec les bactéries de la lumière intestinale et en retenant des peptides antimicrobiens et des immunoglobulines. Ce mucus permet également à différentes cellules spécialisées, telles que les lymphocytes intraépithéliaux, d'évaluer la composition microbienne et d'établir ainsi une cartographie des bactéries commensales ou potentiellement pathogènes (Peterson et Artis, 2014). Les cellules caliciformes sécrètent également des peptides dits en feuille de trèfle (TFF) qui participent à la lutte antimicrobienne en stabilisant le maillage de la couche de mucus, et en contribuant à la régénération de l'épithélium (Lin *et al.*, 2013). Les cellules entéroendocrines sécrètent notamment des hormones métaboliques comme le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), le peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP) ou le peptide tyrosine tyrosine (PYY), intervenant dans la régulation de la prise alimentaire, la dépense énergétique, l'homéostasie du glucose ou encore des lipides (Moran-Ramos *et al.*, 2012). Entre autres, les niveaux de ces hormones sont modifiés dans des maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète de type 2 (Gribble et Reimann, 2016). Au fond des cryptes, les cellules de Paneth jouent un double rôle, à la fois comme participants actifs du maintien de la niche épithéliale, comme nous allons le voir, mais également, comme

producteurs de peptides antimicrobiens, tels que le lysozyme, les α -défensines et Reg3 β/γ , ainsi protégeant l'épithélium intestinal et maintenant l'homéostasie. Le côlon est dépourvu de cellules de Paneth. Une augmentation du nombre de cellules à mucus et de l'épaisseur du mucus dans le côlon assure une bonne homéostasie et permet d'éviter les interactions non voulues du microbiote avec l'épithélium (Clevers et Bevins, 2013).

Les CEI forment non seulement une barrière entre l'hôte et le contenu de la lumière intestinale mais servent aussi d'intermédiaires entre les bactéries et les cellules immunitaires sous-jacentes de la muqueuse, par l'entremise de récepteurs et de molécules de signalisation, comme les cytokines et chimiokines, ce qui facilite les réponses dépendant du milieu externe. Par exemple, plusieurs récepteurs membranaires ou cytoplasmiques, notamment les récepteurs de type Toll (TLR) (Kawasaki et Kawai, 2014) et les récepteurs de type Nod (NLR) (Shaw *et al.*, 2010), lient des produits bactériens, ce qui mène à la production de molécules immunitaires effectrices. Les CEI affectent ainsi la fonction des cellules immunitaires dans la *lamina propria* en transmettant des signaux externes (Peterson et Artis, 2014). Dans cet environnement complexe, des changements dans les interactions entre les différents types de cellules conduisent au développement de désordres intestinaux, tels que les maladies intestinales inflammatoires (MII) ou encore le cancer. Les CEI contribuent donc au maintien de l'homéostasie intestinale en influençant la colonisation bactérienne, en sondant continuellement la microflore environnante et en instruisant le système immunitaire (Asselin et Gendron, 2014).

L'épithélium fait donc partie d'un tissu avec une architecture complexe et dynamique dans lequel les différents types cellulaires agissent de concert pour conserver un équilibre entre ces trois mondes intriqués que sont la lumière intestinale où réside la microflore et le bol alimentaire, l'épithélium en lui-même et la muqueuse sous-jacente (Abreu, 2010).

1.1.3. La niche épithéliale au cœur du maintien de l'homéostasie

La clé du renouvellement rapide des CEI réside dans la niche située au fond des cryptes. Cette zone est constituée de cellules souches pluripotentes qui se divisent rapidement pour former les cellules progénitrices de la zone d'amplification transitoire. Ces cellules se divisent de 2 à 4 fois avant de terminer leur différenciation et de

poursuivre leur migration. Deux types de cellules souches ont été identifiées (Figure 1). Les cellules souches CBC Lgr5+, flanquées par les cellules de Paneth, sont caractérisées par des marqueurs spécifiques, qui assurent leur caractère souche, notamment Lgr5 (Barker *et al.*, 2007), Ascl2 (van der Flier *et al.*, 2009), Olfm4 (van der Flier *et al.*, 2009), Smoc2 (Munoz *et al.*, 2012), Tnfrsf19 (Fafilek *et al.*, 2013) et Rnf43 (Koo *et al.*, 2012). Le premier marqueur de CBC, Lgr5, a été identifié en utilisant le modèle murin Lgr5-EGFP-ires-CreER (Barker *et al.*, 2007). D'autres cellules souches à la position +4 sont davantage impliquées dans la restauration du pool de cellules souches suite à des dommages extrêmes tels que l'irradiation. Ces cellules possèdent des marqueurs spécifiques tels que Hopx (Takeda *et al.*, 2011), Tert (Montgomery *et al.*, 2011), Bmi1 (Sangiorgi et Capecchi, 2008) et Lrig1 (Powell *et al.*, 2012), et présentent notamment une capacité de résistance aux dommages par irradiation. Ainsi, ces cellules peuvent à elles seules repeupler l'épithélium intestinal (van Es *et al.*, 2012). Il a également été démontré que sous certaines conditions, les cellules progénitrices de la zone d'amplification transitoire peuvent renverser le processus de différenciation en redevenant pluripotentes et combler ainsi un manque des cellules souches. Dans ces deux cas, la réversion en CBC serait possible grâce à la conservation d'une certaine plasticité au niveau de la chromatine (Kim *et al.*, 2014).

Plusieurs voies de signalisation sont cruciales dans le maintien de la niche proliférative et dans la différenciation des cellules progénitrices, notamment les voies WNT/ β -caténine, Notch, BMP et le facteur de croissance transformant, beta (TGF β), ou encore celles de facteurs de croissance comme EGF (Figure 2). Ces voies interagissent entre elles pour régulariser la prolifération et la différenciation des CEI, avec des rôles ambivalents pour certains et spécifiques pour d'autres.

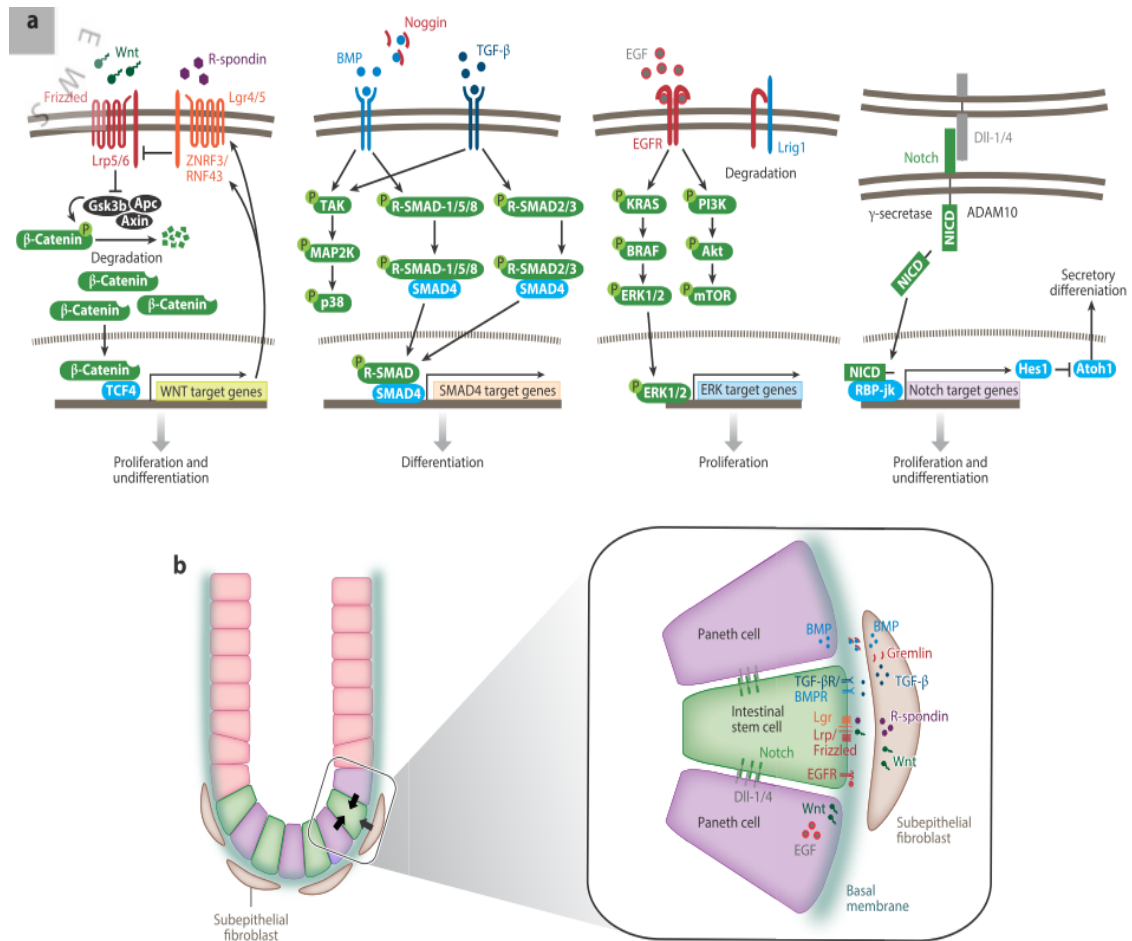


Figure 2 Régulation de l'autorenouvellement des ISC dans la niche. A. Voies de signalisation régulant les ISC. Les signalisations WNT, EGF et Notch régularisent positivement l'autorenouvellement des ISC, alors que la signalisation BMP/TGF β favorise la différenciation de l'épithélium intestinal. **B. Environnement de la niche au fond de la crypte.** Les cellules de Paneth et les myofibroblastes sous-épithéliaux constituent une niche pour les cellules souches de l'épithélium intestinal (Tirée de (Date et Sato, 2015)).

En plus de ces différentes voies, l'autre élément nécessaire est l'environnement direct de la crypte épithéliale. Plusieurs travaux ont démontré que l'environnement à lui seul peut supporter le développement normal de l'épithélium intestinal en maintenant le caractère souche des CBC, sans affecter les processus de maturation des cellules progénitrices (Kabiri *et al.*, 2014). L'environnement pourrait donc compenser des défauts épithéliaux dans des voies comme celles de WNT. Des travaux récents ont apporté de nouvelles données appuyant les fonctions de WNT dans l'intestin murin et celles de l'environnement, en utilisant une méthode impliquant l'inhibition du gène

Porcupine (*Porcn*). *Porcn* code pour une O-acyltransférase qui assure la liaison de groupements palmitoleate sur tous les facteurs WNT chez les vertébrés, ce qui est nécessaire à leur sécrétion. La délétion de *Porcn* dans l'épithélium intestinal murin contourne le problème de redondance. En effet, la suppression d'un seul WNT n'a que peu d'effet, dû à la compensation par les autres. Les résultats montrent que la délétion épithéliale de *Porcn* n'affecte pas la lignée intestinale et que la β -caténine nucléaire, un indicateur de l'activation de la voie de WNT, reste présente dans les cellules souches cryptales. Ceci suggère que la muqueuse sous-jacente peut compenser la perte de *Porcn* en fournissant le WNT nécessaire au maintien du caractère souche et prolifératif des CBC (San Roman *et al.*, 2014). Par contre, un traitement avec un antagoniste de WNT, qui affecte toute la muqueuse, résulte en une réduction de la signalisation WNT, ce qui corrèle avec l'arrêt de prolifération des cellules souches et progénitrices, couplé à un dysfonctionnement dans la différenciation de la lignée sécrétrice (Kuhnert *et al.*, 2004).

La voie Notch est une autre voie importante. Un traitement avec un inhibiteur de la voie Notch, un dérivé de la benzodiazépine inhibant la gamma-sécrétase (DBZ), convertit les cellules souches en cellules à mucus, résultant d'une perte du caractère souche, perte qui n'est pas observée chez les souris sans ATOH1, un régulateur de la voie sécrétrice. Ceci suggère que l'activation de Notch est requise pour le maintien des cellules souches en désactivant la différenciation induite par ATOH1 (van Es *et al.*, 2010). Ces études montrent qu'ATOH1 et Notch jouent des rôles opposés dans la promotion des cellules sécrétrices par rapport aux entérocytes. L'activité de la voie de Notch par rapport à ATOH1 détermine si un progéniteur intestinal se différencie en cellules absorbantes (Notch actif) ou sécrétrices (ATOH1 actif) (Kim *et al.*, 2014).

Plusieurs autres voies affectent également la niche épithéliale intestinale, notamment en réponse à différents stress, comme la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) et le signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). mTOR détecte et répond aux éléments nutritifs, à l'énergie, au stress et aux facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance insulino-like (IGF), pour coordonner la croissance et la survie des cellules (Laplanche et Sabatini, 2012). Les cibles directes du complexe 1 de mTOR (mTORC1), comme 4E-BP1 et la protéine ribosomale S6 kinase 1 (S6K1), favorisent la synthèse des protéines, des lipides et la biogénèse des ribosomes, tandis que l'autophagie par les lysosomes est régulée par d'autres cibles de

mTORC1 en aval (Proud, 2009). mTORC2 quant à lui participe à la survie cellulaire, le métabolisme ou encore dans la dynamique du cytosquelette (Oh et Jacinto, 2011). La perte de la signalisation mTOR provoque des défauts dans les CEI (Sampson *et al.*, 2016).

STAT3 est un facteur de transcription principalement activé en réponse à des stimuli par des cytokines (interleukine 6 (IL6), interleukine 22 (IL22)) via l'activation du sentier Janus kinase (JAK)-STAT (Grivennikov *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2011). Son activation résulte en une protection de l'épithélium intestinal, avec l'induction de l'expression de plusieurs peptides antimicrobiens tels que REG3 γ et la phospholipase A2 Groupe IIA (PLA2G2a) (Wittkopf *et al.*, 2015). STAT3 participe également à la régénération de l'épithélium suite à des dommages (Karin et Clevers, 2016). Des analyses d'associations pangénomiques (étude d'association à l'échelle du génome (GWAS)) ont mis en évidence des polymorphismes associés à *STAT3* ou d'autres gènes de la voie augmentant le risque de développer des MII (Cenit *et al.*, 2010). Je discuterai plus en détail ces sentiers de signalisation dans les prochaines sections, et je vais à présent aborder les aspects pathologiques des maladies inflammatoires intestinales.

1.1.4. Les maladies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MII), dont la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, résultent de la convergence de facteurs génétiques et environnementaux, ainsi que de défauts de la fonction barrière, qui aboutissent finalement à une réponse immunitaire anormale et à une plus grande sensibilité à l'inflammation intestinale (Khor *et al.*, 2011). En effet, des études d'association pangénomique ont identifié plus de 200 loci associés aux MII ou à d'autres maladies inflammatoires et auto-immunes (Jostins *et al.*, 2012, Cleynen et Vermeire, 2015, Luo *et al.*, 2017). Plusieurs voies de signalisation régularisant l'homéostasie intestinale, l'immunité et les interactions avec le microbiome intestinal ou la diète, ont été identifiées, de même que plusieurs types cellulaires pouvant être modifiés par ces altérations génétiques, notamment les cellules dendritiques, les lymphocytes T auxiliaires (Th) de type Th1, Th2, Th17 et lymphocytes T régulateurs (Treg), et les CEI (Foersch *et al.*, 2013, Rapozo *et al.*, 2017) (Figure 3).

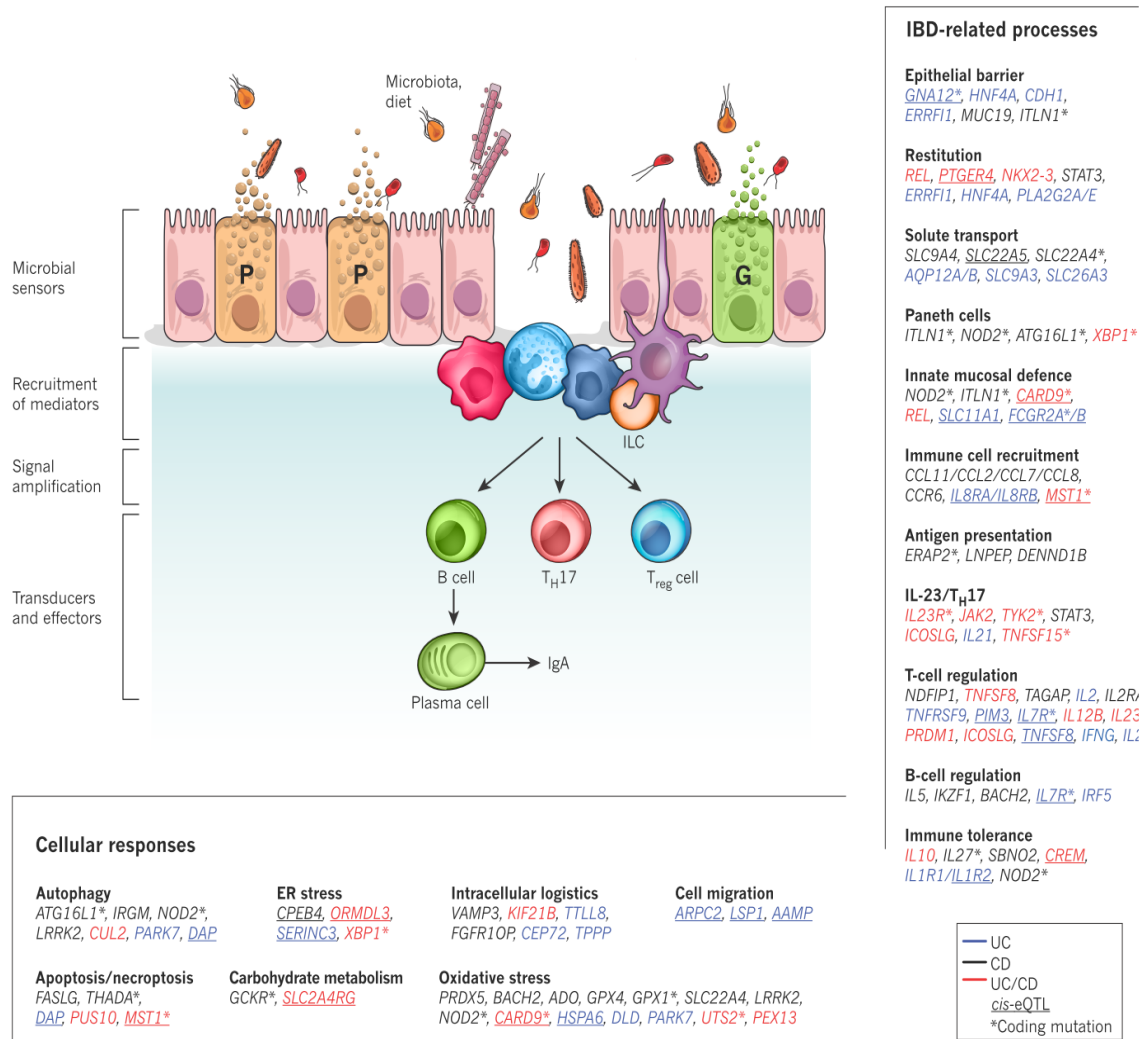


Figure 3 Les études d'association pangénomique ont identifié des voies de signalisation et des types cellulaires associés aux MII. L'homéostasie intestinale implique des actions coordonnées entre les cellules épithéliales, et les cellules immunitaires innées et adaptatives. Entre autres, des défauts de perméabilité de la barrière peuvent permettre une infiltration microbienne, détectée par le système immunitaire inné, qui génère les réponses adaptatives, inflammatoires et restitutives appropriées. Ces effets se font en partie par la libération de médiateurs extracellulaires qui recrutent d'autres composants, comme les cellules immunitaires adaptatives et innées. La génétique, le microbiote et les facteurs immunitaires affectent l'équilibre de ces signaux. Les gènes associés aux MII sont regroupés et classés en fonction de leurs fonctions dans le contexte de l'homéostasie intestinale et de l'immunité. La couleur du texte indique si les gènes sont liés aux loci de risques associés à la maladie de Crohn (CD, noir), à la colite ulcéreuse (UC, bleu) ou aux deux (rouge) (Tirée de (Khor *et al.*, 2011))(Numéro de licence 4174260873587).

L'inflammation intestinale est donc le résultat d'une composante multifactorielle. Par exemple, le développement des MII a été associé à des modifications dans la séquence du gène de la protéine 1 de liaison X (*Xbp1*), associé à l'autophagie, ou de *Nod2*, récepteur associé à la reconnaissance de produits bactériens, à une diminution d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire ou au développement d'une intolérance immunitaire aux produits microbiens, entre autres (Kaser *et al.*, 2008, Watanabe *et al.*, 2008). Il a été aussi démontré que la perméabilité de l'épithélium chez les personnes atteintes de MII est augmentée, ce qui suggère des défauts de la fonction barrière. Par exemple, les patients montrent une réduction de la couche de mucus protectrice comprenant la mucine de type 2, ou MUC2. Des études expérimentales ont montré que des souris dépourvues de *Muc2* développent une colite spontanée (Van der Sluis *et al.*, 2006, Tadesse *et al.*, 2017). Des souris n'exprimant pas les TFF sont plus sensibles à l'induction d'une colite chimique par le dextran sulfate (Podolsky *et al.*, 2009). La sécrétion de peptides antimicrobiens est diminuée chez les patients présentant des mutations dans les gènes *TLR* reconnaissant certains produits bactériens (Elia *et al.*, 2015) ou encore dans le gène *IL23*, cytokine impliquée dans la maturation des lymphocytes Th17 proinflammatoires (Weaver *et al.*, 2013). Ces gènes ne sont qu'une petite partie de ceux déterminés par les analyses d'association pangénomique (Figure 3) (Podolsky *et al.*, 2009, Maloy et Powrie, 2011).

En plus de la réponse altérée au microbiote, qui peut être lui-même altéré par l'environnement et la génétique, les MII sont associées à des facteurs environnementaux avec des effets de l'allaitement, de la nourriture, du tabagisme ou encore des médicaments. Le fait que l'incidence des MII augmente dans les populations humaines et que les jumeaux monozygotes montrent souvent une divergence au niveau de leur sensibilité aux MII confirment l'importance de facteurs environnementaux indépendants des altérations génétiques au niveau du génome. Il faut aussi noter que plusieurs polymorphismes nucléotidiques simples associés aux gènes de sensibilité aux MII se retrouvent dans des régions non-codantes associées à des promoteurs et amplificateurs (Albert, 2011). Cette importance de l'environnement dans la genèse des MII suggère un rôle pour la régulation épigénétique, qui mène à des changements dans l'expression des gènes sans altérer la séquence d'ADN (Feil et Fraga, 2012). Les principaux mécanismes épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, dont la méthylation sur lysine ou arginine, l'acétylation sur

lysine, et la phosphorylation sur sérine ou tyrosine (Allis et Jenuwein, 2016). Ces modifications épigénétiques traduisent des modifications dans l'environnement, qui affectent entre autres le métabolisme cellulaire ou la composition du microbiote, en modifiant de manière permanente ou transitoire l'expression des gènes (Ling et Groop, 2009, Kellermayer, 2012). Ces mécanismes épigénétiques peuvent donc changer la réponse transcriptionnelle suite à des signaux environnementaux. Cela représente donc un mécanisme critique liant la prédisposition génétique de l'hôte aux facteurs environnementaux dans la pathogenèse des MII (Ventham *et al.*, 2013). L'épigénétique apparaît donc comme une nouvelle variable, non négligeable, à intégrer dans la compréhension des MII. Je vais élaborer davantage sur l'épigénétique, particulièrement les modifications touchant l'acétylation, dans les sections suivantes.

1.2. Noyau, ADN, chromatine et épigénétique

1.2.1. Chromatine et épigénétique: organisation et remodelage

Dans le noyau cellulaire, l'ADN est compacté sous forme de chromatine, dont l'unité de base est le nucléosome. Celui-ci est formé d'un octamère d'histones conventionnelles, soient 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4, autour duquel vient s'enrouler l'ADN, à raison de 2 tours, soit 147 pb. La chromatine de base a une activité répressive sur la transcription. Afin de régulariser l'expression des gènes, la structure de la chromatine doit être modulée de façon réversible afin de rendre l'ADN accessible ou non pour la fixation de facteurs de transcription et pour le recrutement d'activités enzymatiques régulatrices modifiant la chromatine par des activités épigénétiques (Smolle et Workman, 2013). L'épigénétique constitue un ensemble de changements dans l'activité d'un gène qui ne sont pas dus à des mutations dans la séquence d'ADN.

Plus d'une centaine de gènes codent pour trois types de protéines, à savoir les « *writers* », « *erasers* » et « *readers* », qui modifient l'ADN ainsi que les protéines, notamment les histones (Badeaux et Shi, 2013). Les « *writers* », comme les acétyltransférases (HAT) et les méthyltransférases, ainsi que les « *erasers* », comme les désacétylases (HDAC), les sirtuines ou les déméthylases, ajoutent ou suppriment, respectivement, une modification chimique telle que le groupement acétyle ou méthyle (Chen et Dent, 2014). Ces modifications post-traductionnelles sur les histones agissent comme des signaux reconnus par les « *readers* », des protéines contenant entre autres,

soit un bromodomaine qui lie les marques acétyles, soit un chromodomaine qui lie les marques méthyles (Rando, 2012, Kaelin et McKnight, 2013). Les « *readers* » induisent ensuite des changements d'état de la chromatine, résultant en l'activation ou la répression de la transcription (Zhou *et al.*, 2011) (Figure 4). Actuellement, plus de soixante modifications incluant la phosphorylation, l'ubiquitination, la butyrylation, la crotonylation, et bien d'autres, ont été dénombrées sur la chromatine (Tan *et al.*, 2011). L'ensemble de ces modifications forme ce que l'on appelle communément le code histone. Une modification épigénétique à la base de mon travail est l'acétylation.

Il a longtemps été considéré que l'activité d'acétyltransférase, par l'ajout de charge acétyle qui neutralise les charges positives sur les queues des histones, relaxait la chromatine et augmentait l'accès des facteurs de transcription à l'ADN et l'expression des gènes. Les désacétylases avaient quant à elles l'effet opposé, menant à une compaction de la chromatine, donc une répression de l'expression des gènes. Ce n'est que depuis les dernières années que le code histone, structure dynamique et finement régularisé, apparaît comme un cadre de lecture pour l'expression des gènes. Ce cadre de lecture peut être influencé aussi bien positivement que négativement par les « *readers* », « *writers* » et « *erasers* » (Falkenberg et Johnstone, 2014).

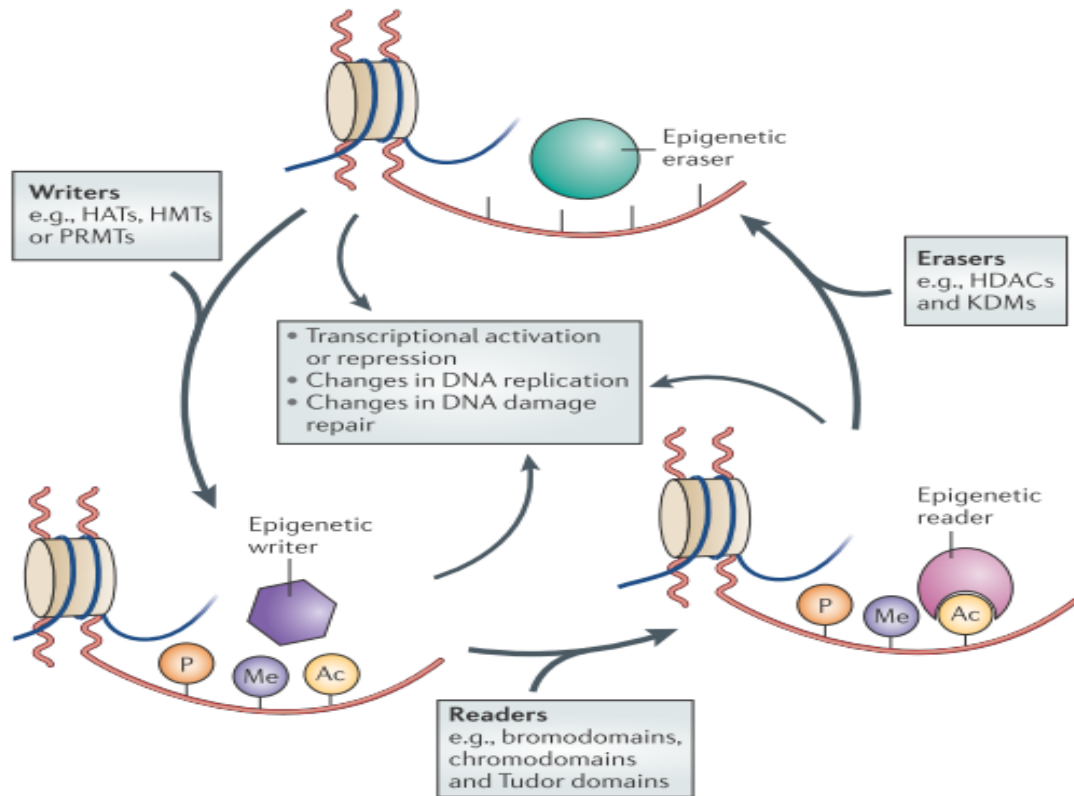


Figure 4 La régulation épigénétique est un processus dynamique. Les « *writers* », tels que les histone acétyltransférases (HAT), les histone méthyltransférases (HMT), les protéines arginine méthyltransférases (PRMT) et les kinases, ajoutent des marques sur les queues histones. Les « *readers* », tels que les protéines contenant des bromodomains, des chromodomains ou des domaines Tudor, se lient aux marques épigénétiques acétyles ou méthyles. Les « *erasers* », tels que les histone désacétylases (HDAC), les lysine déméthylases (KDM) et les phosphatases, catalysent l'élimination de ces marques épigénétiques. L'ensemble de ces modifications sur les histones régularisent divers processus dépendant de l'ADN, incluant la transcription, la réplication de l'ADN et la réparation de l'ADN (Tirée de (Falkenberg et Johnstone, 2014))(Numéro de licence 4174261006459).

En effet, il est reconnu que plusieurs modifications sur les histones sont retrouvées préférentiellement sur des promoteurs ou des amplificateurs, donnant une mesure de leur activité. Par exemple, alors que la marque H3K4me1 est plutôt associée aux amplificateurs actifs, la marque H3K4me3 est associée à des promoteurs actifs. Au contraire, des zones hautement stables et inactives, souvent associées à une marque H3K9me3, sont retrouvées sur l'ADN méthylé (Calo et Wysocka, 2013).

1.2.2. L'acétylation et l'acétyl-CoA: un métabolite à la croisée des chemins

L'acétylation des protéines est une modification post-traductionnelle majeure régulée par les HAT et les HDAC qui, respectivement, ajoutent ou éliminent un groupement acétyle sur les lysines (Yang et Seto, 2008). De nombreuses autres protéines nucléaires, cytoplasmiques et mitochondriales sont acétylées, formant l'acétylome (Choudhary *et al.*, 2009).

L'acétylation des histones relâche les interactions ADN-histone et crée des sites de liaison pour les protéines qui contiennent entre autres, des bromodomains, qui traduisent les modifications acétyles en changements de la structure de la chromatine et de l'expression des gènes (Sanchez et Zhou, 2009). L'acétylation, comme la phosphorylation des histones, modifie la charge des histones, ce qui n'est pas le cas pour la méthylation (Zhang *et al.*, 2015). Contrairement à l'acétylation qui est une marque avec une courte demi-vie, la méthylation est une modification beaucoup plus stable et plus difficile à retirer que ne l'est l'acétylation (Zheng *et al.*, 2013). C'est en partie pourquoi les grandes zones non transcrites de l'ADN sont méthylées (Barth et Imhof, 2010).

L'acétylation de protéines, comme les facteurs de transcription, modifie leur fonction en affectant les interactions avec d'autres protéines ou avec l'ADN, ainsi que la stabilité ou encore la localisation (Patel *et al.*, 2011, Choudhary *et al.*, 2014). Cela peut mener autant à des effets de stabilisation et d'augmentation d'efficacité, comme c'est le cas pour les dimères du facteur de transcription STAT3 phosphorylés, qui voient leur activité améliorée suite à une acétylation sur Lys685 par CBP, une acétyltransférase (Yuan *et al.*, 2005). Des stress cellulaires, notamment des dommages à l'ADN (Reed et Quelle, 2014), induisent une acétylation du suppresseur de tumeur et facteur de transcription P53, ce qui stabilise la protéine (Sakaguchi *et al.*, 1998). Comme dernier exemple, l'acétylation de HDAC1 entraîne une baisse de son activité désacétylase (Yang *et al.*, 2015).

L'acétylation des protéines est un processus hautement régulé qui varie selon la disponibilité de métabolites cellulaires (Galdieri *et al.*, 2014). En effet, les niveaux d'acétylation des protéines dépendent en partie de la régulation de l'activité HDAC et de

la disponibilité du substrat énergétique, soit l'acétyl-CoA. Par exemple, l'activité HDAC cellulaire est modulée par des inhibiteurs endogènes de HDAC, tels que le β -hydroxybutyrate (Shimazu *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2017) et la carnitine (Huang *et al.*, 2012), dont les niveaux varient en fonction du métabolisme cellulaire. L'activité des HDAC peut aussi être contrôlée par des inhibiteurs exogènes comme le butyrate, un produit de la flore bactérienne, qui sert de substrat énergétique pour les CEI, et qui peut modifier l'expression des gènes, non seulement dans les CEI (Kaiko *et al.*, 2016) mais aussi dans les cellules Treg (Graham et Xavier, 2013). De plus, l'acétylation des histones dépend de la disponibilité du substrat, soit l'acétyl-CoA, à la fois dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques (Wellen et Thompson, 2012, Zhao *et al.*, 2016). Par exemple, le citrate, un produit terminal de la glycolyse, est utilisé par l'ATP-citrate lyase (ACL) pour produire l'acétyl-CoA cytoplasmique. La perte d'ACL réduit les niveaux cellulaires d'acétyl-CoA et également l'acétylation des histones (Bracha *et al.*, 2010). D'autres enzymes, telles que l'acétyl-CoA synthétase et le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH), participent également à la formation du pool d'acétyl-CoA nucléaire (Sutendra *et al.*, 2014, Mews *et al.*, 2017). Ainsi, les variations d'énergie cellulaire menant à des changements dans les niveaux d'acétyl-CoA ou de métabolites inhibant les HDAC, peuvent entraîner des altérations globales au niveau de l'acétylome et de la signalisation épigénétique (Kaelin et McKnight, 2013).

1.2.3. La famille des HDAC: distribution, fonctions et pathologies

Les HDAC sont des enzymes divisées en quatre classes selon leur homologie. La classe I comprend les HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8 nucléaires. HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9, membres de la classe IIa, de même que HDAC6 et HDAC10, membres de la classe IIb, se retrouvent à la fois dans le cytoplasme et le noyau. HDAC11, le seul membre de la classe IV, présente des points communs avec les enzymes des classes I et II. Une dernière classe comprend les sirtuines homologues des protéines SIR2 de la levure (Shore, 2000). Les HDAC ont pour fonction de retirer les groupements acétyles sur les lysines de différentes protéines comme des histones ou des facteurs de transcription. Deux mécanismes de retrait du groupement acétyle sont utilisés. Dans le premier mécanisme, dans le cas des HDAC à activité dépendante du Zn^{2+} (classes I, II et IV), l'ion Zn^{2+} stabilise le substrat acétylé dans la poche catalytique (Seto et Yoshida, 2014). Dans le deuxième mécanisme, l'activité des sirtuines est dépendante du NAD^+ . La plupart des HDAC classiques s'associent, sous forme

d'homo- ou d'hétérodimères, avec d'autres protéines pour former des complexes co-répresseurs transcriptionnels tels que « *switch-independent 3 protein a* » (SIN3), « *nucleosome remodelling and deacetylation* » (NuRD), « *co-repressor for RE1 silencing transcription factor* » (CoREST), « *nuclear receptor co-repressor* » (NCOR) et « *Nuclear receptor corepressor 2* » (SMRT), souvent associés avec des enzymes impliquées dans le remodelage de la chromatine (Kelly et Cowley, 2013). Les HDAC ne possèdent pas de site de liaison direct avec l'ADN, et donc dépendent des protéines faisant partie des complexes et des facteurs de transcription pour être recrutés à l'ADN et ainsi exercer le clivage des groupements acétyles (Bannister et Kouzarides, 2011). Les complexes HDAC contribuent à la répression ou à l'activation des gènes (Olzscha *et al.*, 2015) (Tableau 1).

| Classe | Membres | Substrats | Complexe | Co-Facteur | Localisation Cellulaire | Fonctions Physiologiques | Expression |
|--------|---------|---|-------------------------------|------------------|-------------------------|--|-------------------|
| I | HDAC1 | p53, MyoD, E2F-1, Stat3, androgène | Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST | Zn ²⁺ | Noyau | Prolifération cellulaire et survie | Ubiquitaire |
| | HDAC2 | Bcl-6, Stat3, récepteur des glucocorticoïdes, YY-1 | Sin3, Mi-2/NuRD, CoREST | Zn ²⁺ | Noyau | Prolifération cellulaire et résistance à l'insuline | |
| | HDAC3 | GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP | N-CoR/SMRT | Zn ²⁺ | Noyau | Prolifération cellulaire et survie | |
| | HDAC8 | | EST1B | Zn ²⁺ | Noyau | Prolifération cellulaire | |
| IIa | HDAC4 | GCMa, GATA-1, HP-1 | ANKRA, RFXANK | Zn ²⁺ | Noyau/Cytoplasme | Contrôle de la dynamique du cytosquelette et de la mobilité cellulaire | Tissue-spécifique |
| | HDAC5 | Smad7, HP-1, GCMa | REA, récepteur aux estrogènes | Zn ²⁺ | Noyau/Cytoplasme | Gluconéogenèse, croissance cardiovasculaire et la fonction des cellules endothéliales | |
| | HDAC7 | Flag1 et 2 | HIF1a, Bcl-6 | Zn ²⁺ | Noyau/Cytoplasme | Glycogénèse, fonction endothéliale et différenciation des thymocytes | |
| | HDAC9 | | FOXP3 | Zn ²⁺ | Noyau/Cytoplasme | Croissance et fonction cardiovasculaire, recombinaison homologue et différenciation des thymocytes | |
| IIb | HDAC6 | α -Tubuline, HSP90, SHP, Smad7 | A3G - AURKA | Zn ²⁺ | Cytoplasme | Contrôle de la dynamique du cytosquelette et de la mobilité cellulaire | Tissue-spécifique |
| | HDAC10 | HSP90 | | Zn ²⁺ | Cytoplasme | Survie cellulaire médiée par l'autophagie et la recombinaison homologue | |
| III | SIRT1 | p53, Ku70, PPAR- γ , PGC-1 α , NF- κ B, p300, FOXO | | NAD ⁺ | Noyau/Cytoplasme | Régulation du système immunitaire, survie cellulaire, vieillissement et régulation redox | Variable |
| | SIRT2 | α -Tubuline, histone H4, FOXO, ACLY | | NAD ⁺ | Noyau | Survie cellulaire, migration cellulaire et invasion | |
| | SIRT3 | AceCS2, PGC-1 α | | NAD ⁺ | Mitochondrie | Balance redox, régulation de l'ATP et métabolisme, cycle de l'urée, apoptose et signalisation cellulaire | |
| | SIRT4 | Glutamate déshydrogénase | | NAD ⁺ | Mitochondrie | Régulation et métabolisme de l'ATP, métabolisme énergétique, apoptose et signalisation cellulaire | |
| | SIRT5 | CPS1, SOQ1, HMGCS2 | | NAD ⁺ | Mitochondrie | Régulation de l'ATP, cycle de l'urée, métabolisme énergétique, apoptose et signalisation cellulaire | |
| | SIRT6 | ADN polymérase β , PARP1, NF- κ B | | NAD ⁺ | Noyau | Régulation métabolique | |
| | SIRT7 | ARN polymérase I, PAF53 | | NAD ⁺ | Noyau | Apoptose | |
| IV | HDAC11 | | HDAC6 | Zn ²⁺ | Noyau | Immunomodulation et réplication de l'ADN | Ubiquitaire |

Tableau 1 Principales fonctions associées aux différentes HDAC dans l'organisme.

(Adapté de (Witt *et al.*, 2009)).

1.2.4. HDAC1 et HDAC2: redondances et spécificités

Parmi les 18 « *erasers* » connus avec une activité histone désacétylase, HDAC1 et HDAC2 sont des désacétylases nucléaires de classe I avec plus de 85% d'homologie au niveau du gène, et dont l'activité est dépendante du zinc (Kelly et Cowley, 2013). Les gènes codant pour HDAC1 et HDAC2 ont été dupliqués à partir d'un gène ancestral. Les deux protéines présentent une similarité de séquence d'acides aminés de 86% entre la souris et l'homme, ce qui suggère une redondance fonctionnelle élevée entre HDAC1 et HDAC2. HDAC1 et HDAC2 sont deux des sous-unités catalytiques de complexes multiprotéiques tels que SIN3A, CoREST et NuRD (Laugesen et Helin, 2014). HDAC1 et HDAC2 ont à la fois des rôles de répression ou d'activation de l'expression des gènes. Ces protéines peuvent retirer le groupement acétyle sur les lysines des histones, affectant de manière globale ou spécifique l'expression des gènes (Jurkin *et al.*, 2011), ou elles peuvent également retirer directement le groupement acétyle sur des régulateurs de la transcription, entre autres (Jamaladdin *et al.*, 2014). Par exemple, HDAC1 réprime l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B en désacétylant la sous-unité p65 (Ashburner *et al.*, 2001, Gonneaud *et al.*, 2014).

Afin de démontrer le rôle physiologique de HDAC1 et HDAC2, plusieurs études ont invalidé l'un ou l'autre des gènes ou les deux, par différentes approches génétiques, dans des lignées cellulaires et des modèles animaux. Ces travaux ont démontré des fonctions biologiques redondantes et non redondantes de HDAC1 et de HDAC2. Dans la plupart des lignées cellulaires, la suppression de HDAC1 ou HDAC2 n'a que peu d'effet sur la prolifération et le cycle cellulaire, probablement dû à une compensation de l'un par l'autre (Kelly et Cowley, 2013). Par contre, certaines lignées cellulaires sont plus sensibles à la perte d'un des gènes. Par exemple, nous avons montré que l'absence de *Hdac1* réduit la prolifération des CEI de rat de la lignée IEC-6 (Gonneaud *et al.*, 2014). Cependant, la suppression combinée de *Hdac1* et de *Hdac2* entraîne des phénotypes beaucoup plus sévères avec une réduction et un arrêt de la prolifération, résultant d'un blocage en phase G1 à S dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (Yamaguchi *et al.*, 2010), et une augmentation des dommages à l'ADN dans les cellules HeLa et les HEK 293 (Bhaskara *et al.*, 2013).

Un rôle important de HDAC1 et de HDAC2 dans le contrôle de la division cellulaire et la pluripotence des cellules souches embryonnaires a été déterminé. Dans ces cellules, la perte de *Hdac1* et *Hdac2* déstabilise les complexes co-répresseurs tels que SIN3a. L'activité désacétylase totale diminue de 60%, ce qui est associé à une augmentation globale de l'acétylation des histones. Ceci indique que HDAC1 et HDAC2 sont des désacétylases cellulaires majeures. La délétion de *Hdac1* et *Hdac2* réduit l'expression des gènes à caractère souche embryonnaire comme Oct4 ou Nanog, et entraîne une ségrégation chromosomique défectueuse, menant à une perte de la viabilité cellulaire. HDAC1 et HDAC2 ont donc des fonctions essentielles dans la division cellulaire et dans l'expression des gènes dépendant de l'activité désacétylase (Jamaladdin *et al.*, 2014).

La perte de *Hdac1* et de *Hdac2* provoque des dommages à l'ADN et un stress de réplication, observé par une accumulation de gamma H2A.X (phospho S139) (γ H2AX), une forme phosphorylée de l'histone H2AX et un marqueur de cassure d'ADN double brin, dans les cellules HeLa et les HEK 293. Ceci affecte aussi la structure de la chromatine naissante, en modifiant les marques épigénétiques, comme une augmentation de l'acétylation, et en réduisant la vitesse de la fourche de réplication (Bhaskara *et al.*, 2013).

Lors de la maturation des ovocytes et pendant le développement de l'embryon au cours de la pré-implantation, HDAC1 et HDAC2 interviennent séparément et jouent chacun un rôle essentiel et complémentaire. Par exemple, HDAC1 est stockée dans le cytoplasme pendant la maturation des ovocytes puis va ensuite au noyau et les niveaux se normalisent avec ceux de HDAC2. HDAC2 est la HDAC principale pour la maturation des ovocytes en régularisant l'acétylation des histones, la transcription et la méthylation de l'ADN. Par exemple, HDAC2 favorise la désacétylation de la marque H4K16ac qui est nécessaire à la ségrégation chromosomique normale lors de la maturation des ovocytes (Ma et Schultz, 2016).

En plus des lignées cellulaires, l'effet de la délétion de *Hdac1* et de *Hdac2* a été étudié dans de nombreux modèles murins, de façon globale ou tissu-spécifique. La délétion globale de *Hdac1* chez la souris est létale en raison de problèmes majeurs de développement embryonnaire, associés à des défauts de prolifération (Lagger *et al.*,

2002) alors que la délétion de *Hdac2* entraîne la mort de la souris après la naissance en raison de sévères défauts cardiaques (Montgomery *et al.*, 2007). De la peau au cerveau en passant par le cœur, la suppression spécifique de *Hdac1* et/ou *Hdac2* a montré des fonctions spécifiques, différentes et compensatoires.

Par exemple, le développement de l'épiderme est sous le contrôle de *Hdac1* et *Hdac2*. Alors que la délétion de l'un d'eux uniquement dans l'épiderme ne perturbe ni la structure de la peau, ni la viabilité de l'animal, la suppression d'un seul allèle de *Hdac2* chez des souris sans *Hdac1* dans l'épiderme induit des défauts graves dans le développement des lignées épidermiques, et mène à la formation spontanée de tumeurs. Ces résultats suggèrent que des variations des niveaux d'activité de HDAC1 et HDAC2 peuvent mener à différents phénotypes. Ceci ajoute un autre niveau de complexité avec un besoin de garder un niveau minimum critique d'activité des HDAC pour maintenir un phénotype normal dans l'épiderme (Winter *et al.*, 2013).

Dovey *et al.* (Dovey *et al.*, 2013) ont montré dans les lymphocytes T, un effet positif sur la prolifération cellulaire lorsqu'il n'y avait plus qu'un seul allèle de *Hdac2* en l'absence de *Hdac1*, ce qui favorise la formation de tumeurs. Dans le cerveau, HDAC1 est exprimé dans les astrocytes mais pas dans les neurones différenciés, alors que HDAC2 a un profil d'expression inverse. De manière intéressante, la délétion de *Hdac1* dans le cerveau mène à la réexpression de *Hdac2* dans les astrocytes, alors que la délétion de *Hdac2* entraîne la réexpression de *Hdac1* dans les neurones matures. Ceci montre les capacités compensatoires de ces deux enzymes. Par contre, la perte des deux gènes entraîne un sévère retard de croissance et de maturation des différentes parties du cerveau pendant l'embryogénèse (Hagelkruys *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces travaux a mis en évidence des fonctions biologiques cruciales pour HDAC1 et HDAC2, entre autres tant au niveau du développement tissulaire et de la différenciation que de la prolifération. Ces deux enzymes présentent des fonctions partagées, complémentaires et distinctes. Cela en fait des cibles de choix dans certaines pathologies. C'est pourquoi l'utilisation de modèles génétiques d'inactivation des gènes en parallèle avec l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC est nécessaire pour comparer et évaluer leur mode d'action. Ce type d'approche permet d'évaluer la spécificité, les avantages et les inconvénients de l'inhibition des HDAC.

1.2.5. Les inhibiteurs de HDAC: avancées et développement

En régularisant de nombreuses fonctions cellulaires (Tang *et al.*, 2013), par exemple l'inflammation et l'immunité (Glauben *et al.*, 2014), ainsi que la prolifération et la différenciation dans plusieurs modèles (de Zoeten *et al.*, 2010), les histones désacétylases sont devenues un centre d'intérêt important, notamment par l'étude de leur inhibition dans différentes maladies humaines comme le cancer (Newbold *et al.*, 2016), les maladies neurodégénératives (Suo *et al.*, 2015) et l'inflammation (Halili *et al.*, 2009).

Dans le cas des cellules cancéreuses, les niveaux d'expression des *Hdac* varient considérablement (Spiegel *et al.*, 2012). Par exemple, l'expression de *Hdac1* est augmentée dans les cancers de la prostate, de l'intestin et du sein (Halkidou *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2005, Sudo *et al.*, 2011), et l'expression de *Hdac2* est augmentée dans les cancers colorectal, du col utérin et gastrique (Zhu *et al.*, 2004, Song *et al.*, 2005). L'expression de *Hdac3* est aussi augmentée dans les tumeurs du côlon et du sein (Wilson *et al.*, 2006), alors que celle de *Hdac6* est élevée dans les tumeurs mammaires, celle de *Hdac8* dans les cellules de neuroblastome (Oehme *et al.*, 2009) et celle de *Hdac11* principalement dans des lignées cellulaires de carcinome hépato-cellulaire ou du sein canalaire (Deubzer *et al.*, 2013). Ces différences d'expression ont encouragé les chercheurs à développer des inhibiteurs pharmacologiques de l'activité des HDAC (HDACi) et à les utiliser sur les cellules cancéreuses, ce qui a mené à des observations montrant une sensibilité accrue des cellules cancéreuses à l'action des HDACi, par rapport aux cellules normales, et à l'identification de différentes cibles cellulaires affectées par l'inhibition des HDAC, notamment la prolifération, l'apoptose et l'autophagie (Figure 5). De par leurs multiples effets, de nombreux HDACi ont été développés, dont 5 sont actuellement approuvés par la FDA pour traiter des cancers, comme celui du lymphome à cellules T (Eckschlager *et al.*, 2017).

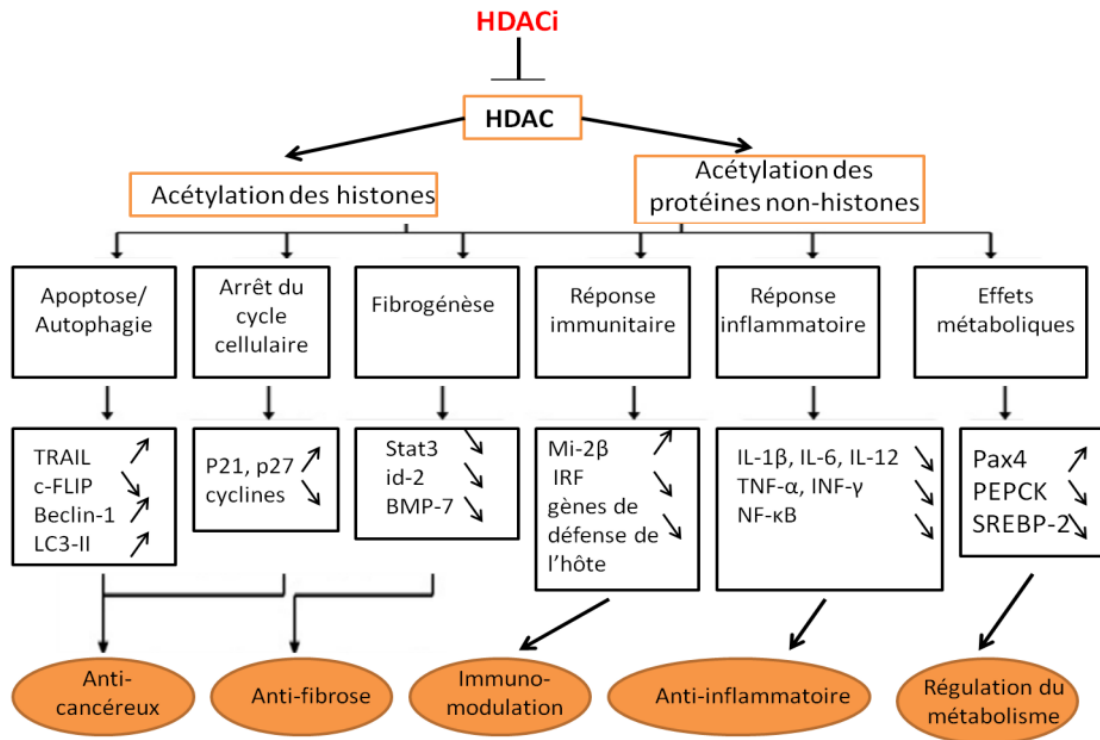


Figure 5 L'inhibition des HDAC par des HDACi affectent de nombreux processus cellulaires. L'inhibition des HDAC augmente l'acétylation des histones et de protéines non-histones, ce qui altère de nombreux processus physiologiques et pathologiques, comme l'apoptose/autophagie, le cycle cellulaire, la fibrogénèse, la réponse immunitaire, l'inflammation et le métabolisme. Par conséquent, les HDACi sont de plus en plus considérés en tant qu'agents thérapeutiques anticancéreux, anti-inflammatoires, immunomodulateurs et comme régulateurs de troubles métaboliques (Adaptée de (Tang *et al.*, 2013)).

Les HDACi sont considérés comme des pan-inhibiteurs s'ils agissent contre tous les types de HDAC, mais les inhibiteurs peuvent cibler des classes particulières, comme les inhibiteurs de classe I comprenant CI994, ou des formes de HDAC spécifiques, comme les inhibiteurs contre HDAC3 (Malvaez *et al.*, 2013) ou HDAC6 (Namdar *et al.*, 2010). Les HDACi sont classés en cinq classes de composés, soient les acides hydroxamiques, les acides gras à courte chaîne comme le butyrate, les benzamides, les tétrapeptides cycliques et les inhibiteurs de sirtuines incluant le nicotinamide, un pan inhibiteur, et des inhibiteurs spécifiques de SIRT1 et SIRT2, le sirtinol et le cambinol (Qin *et al.*, 2017). Plusieurs inhibiteurs sont dits naturels car ils sont retrouvés dans l'alimentation, ou sont modifiés par la flore intestinale, entre autres (Losson *et al.*, 2016). Les acides gras à courte chaîne (SCFA), tels que le butyrate, l'acétate et le

propionate, sont des produits provenant de la digestion et de la fermentation des fibres alimentaires. Les SCFA servent de source d'énergie pour les CEI et d'autres cellules du corps et contrôlent la fonction immunitaire, notamment au niveau des macrophages (Chang *et al.*, 2014) et des cellules Treg (Tanoue et Honda, 2012), en partie par leur action inhibitrice de l'activité des HDAC, menant à des altérations dans l'expression des gènes (Licciardi *et al.*, 2010).

L'extrême sensibilité des cellules cancéreuses aux HDACi, contrairement aux cellules normales, cause l'inhibition de la prolifération et de la différenciation, et l'induction de la mort cellulaire, entre autres. De plus, les HDACi réduisent l'angiogenèse et modulent la réponse immunitaire (Ververis *et al.*, 2013, Zhang et Zhong, 2014).

Dans le cas de l'inflammation intestinale, la délétion de *Hdac6* (de Zoeten *et al.*, 2011) ou de *Hdac9* (de Zoeten *et al.*, 2010) chez la souris promeut la formation de lymphocytes Treg, cellules qui protègent de l'inflammation et qui diminuent la réponse immunitaire pro-inflammatoire. Au niveau de la colite ulcéreuse, l'utilisation de HDACi chez la souris, dans un modèle chimique d'induction d'une colite par le dextran sulfate, a permis de réduire la sévérité de la maladie (Glauben *et al.*, 2006, Glauben et Siegmund, 2011), entre autres en réduisant les symptômes inflammatoires au niveau histologique, et en diminuant les niveaux d'ARN de cytokines pro-inflammatoires, comme *l'interféron gamma (Ifn γ)* et le *facteur de nécrose tumorale alpha (Tnfa)*. Deux types d'inhibiteurs ont été utilisés, soit le SAHA, un pan inhibiteur, et l'acide valproïque, un inhibiteur de classe I. L'utilisation des HDACi reste restreinte à cause de leur manque de spécificité, ce qui entraîne certains effets secondaires étant donné leurs rôles dans de nombreux processus cellulaires. En effet, les HDACi provoquent des effets secondaires plus ou moins intenses tels que des nausées, des vomissements ou encore des diarrhées (Davie, 2003). Le développement d'inhibiteurs plus spécifiques et l'accroissement des connaissances sur les rôles et les cibles spécifiques des différents HDAC devraient éventuellement accroître l'utilisation des HDACi en clinique, dépendamment des utilisations et des traitements potentiels.

1.3. HDAC1 et HDAC2 au cœur du développement de l'épithélium intestinal

Afin d'élucider et de comprendre les rôles de *Hdac1* et de *Hdac2* dans l'épithélium intestinal, nous avons développé des modèles murins de délétion de *Hdac1* et *Hdac2* spécifiquement dans les CEI, grâce au système de souris Villine-Cre-LoxP (el Marjou *et al.*, 2004). L'invalidation tissu-spécifique est assurée par le croisement de souris modifiées génétiquement par insertion de séquences LoxP de part et d'autre de l'exon 4 à 7 du gène *Hdac1* et de l'exon 2 à 4 du gène *Hdac2* (Montgomery *et al.*, 2007), avec une souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de la villine, exprimée dans les CEI. Le résultat est une délétion de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI, dès le début de l'expression de la villine au jour 14 du développement embryonnaire.

1.3.1. HDAC1 et HDAC2 participent au maintien de l'homéostasie intestinale

Les souris délétées embryonnairement pour à la fois *Hdac1* et *Hdac2* dans l'épithélium intestinal présentent des défauts importants dans l'architecture du tissu (Turgeon *et al.*, 2013), contrairement à l'absence de modifications visibles de la muqueuse chez les souris dépourvues de *Hdac1* ou *Hdac2* dans l'épithélium (Turgeon *et al.*, 2014). Les souris sans *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI montrent une délocalisation des noyaux le long de la villosité, suggérant une perte de polarité, des invaginations, ainsi qu'un allongement de la zone cryptale, tout ceci associé à une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire, et un allongement de l'intestin grêle. Le nombre de cellules sécrétrices, incluant les cellules de Paneth et les cellules à mucus, est réduit, indiquant un défaut de différenciation qui est en partie expliqué par une activité accrue de la voie de Notch, mesurée par une augmentation de la forme clivée de Notch (Turgeon *et al.*, 2013). La voie de Notch est impliquée à la fois dans le maintien de la niche épithéliale en favorisant la prolifération des cellules souches et dans la différenciation en entérocytes par l'inhibition de ATOH1, facteur de la différenciation en cellules sécrétrices. En plus de la voie de Notch, la voie STAT3 est activée, corrélant avec la présence d'une inflammation chronique, et la voie mTOR est activée, corrélant avec l'hyperplasie et l'allongement de l'intestin grêle observés. La fonction barrière est également affectée avec une augmentation de la perméabilité et une diminution de la claudine 3, une protéine importante dans la formation des jonctions cellules-cellules.

1.3.2. HDAC1 et HDAC2 induisent des réponses inflammatoires distinctes

Des micropuces à partir d'ARN isolés de muqueuse colonique complète et des PCR ont indiqué une augmentation de plusieurs cytokines et plus généralement une inflammation colique basale chez le double mutant (Turgeon *et al.*, 2013). Nous avons voulu déterminer l'effet de l'absence de différents HDAC, notamment *Hdac1* et *Hdac2* par rapport à *Hdac2*, dans la réponse à une colite expérimentale induite par le dextran sulfate (DSS). Alors que les souris sans *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI montrent une aggravation de l'inflammation induite par le DSS par rapport aux souris contrôle, avec une augmentation de mortalité, les souris sans *Hdac2* dans les CEI sont moins affectées que les souris contrôle suite à l'induction de la colite (Turgeon *et al.*, 2014). Ceci corrèle avec l'analyse d'expression des gènes par micropuces à partir d'ARN provenant de la muqueuse du côlon de souris sans *Hdac2* dans les CEI. En effet, les voies biologiques les plus réprimées sont reliées à l'activation du système immunitaire. Contrairement à ces souris, les souris sans *Hdac1* dans les CEI réagissent au traitement par le DSS de façon similaire aux souris contrôle.

La diminution d'expression de *Hdac1* par shARN dans les cellules de crypte de rat IEC-6 entraîne une réduction de la prolifération cellulaire et une altération de la réponse inflammatoire à la cytokine IL1 β par rapport à des cellules contrôle. Nous avons observé notamment un prolongement de la durée de la phosphorylation nucléaire de la protéine NF- κ B p65, et des variations gène-spécifiques (*Ccl2*, *CxCl2*) suite à l'induction par l'IL1 β , comme l'augmentation des niveaux de base et induits de certains gènes, l'augmentation des niveaux induits suite à la stimulation ou encore une diminution des niveaux de base (Gonneaud *et al.*, 2014). Les mesures de cytokines et de chimiokines sécrétées ont confirmé que HDAC1 joue des rôles à la fois comme répresseur et activateur de la signalisation par IL1 β , en partie en diminuant le recrutement de l'ARN polymérase II aux promoteurs de gènes montrant une réduction des niveaux de base, comme *Ccl2* (Gonneaud *et al.*, 2014). Les différences de sensibilité des CEI à l'absence de *Hdac1* *in vivo* et *in cellulo* laissent suggérer que l'environnement de la muqueuse, qui est bien sûr absent dans des cellules en culture, pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie sans *Hdac1* *in vivo*, et qu'une analyse plus détaillée des patrons d'expression dans les CEI sans *Hdac1* *in vivo* serait nécessaire.

1.3.3. HDAC1 et HDAC2 peuvent modifier le fonctionnement de l'épithélium en dérégularisant les voies métaboliques

Un autre point important associé aux HDAC est le métabolisme qui en plus de fournir l'énergie vitale aux cellules, produit l'acétyl-CoA, le substrat nécessaire à l'acétylation des histones, et qui participe à la régulation de l'expression des gènes. Des études protéomiques de type SILAC ont démontré que les cellules IEC-6 sans *Hdac1* présentaient des altérations des voies métaboliques au niveau des voies de dégradation (catabolisme) et quelques processus de synthèse, comme une diminution des voies de synthèse protéique EIF2 et mTOR (Gonneaud *et al.*, 2015). La perte de *Hdac1* conduit à des réponses cellulaires altérées face au stress oxydatif, corrélant avec des augmentations des niveaux basaux et induits de phosphorylation de l'AMPK, un senseur de besoins énergétiques (Hardie, 2011), et la diminution de la production d'ATP. Une augmentation de la biogenèse mitochondriale est également observée. Ainsi, HDAC1 pourrait contrôler le métabolisme des CEI en rendant disponibles les groupes acétyle (Gonneaud *et al.*, 2015). Il est donc possible que l'absence de *Hdac1* ou *Hdac2* dans les CEI *in vivo* pourrait altérer l'expression de gènes ou de protéines associés au métabolisme.

L'ensemble des modèles que nous avons développés nous ont permis d'identifier partiellement certaines voies et certains groupes de gènes modulés par HDAC1 et HDAC2 dans les CEI, mais ne nous permettent pas de répondre à une question fondamentale liée à l'importance de l'environnement extrinsèque de la muqueuse dans nos modèles murins comparativement à l'effet intrinsèque des HDAC dans les CEI. De plus, l'utilisation de lignées cellulaires, telles que les IEC-6, ont leurs limites. L'utilisation d'autres modèles plus représentatifs de l'épithélium intestinal, tels que les modèles d'entéroïdes, serait donc avantageuse.

1.4. Étude des fonctions intrinsèques des CEI par la culture d'entéroïdes

En 2009, un nouveau modèle de culture de CEI a été développé. Les cellules souches épithéliales intestinales exprimant *Lgr5+*, cultivées dans du Matrigel et dans un milieu spécifique de croissance et de différenciation, reconstruisent une structure intestinale appelée "mini-intestin" (Sato *et al.*, 2009). Cette structure est composée d'une zone cryptale proliférative et d'une zone centrale différenciée entourant une lumière et contenant des CEI différenciées, incluant des cellules de Paneth, des cellules

à mucus et des entérocytes (Sato *et al.*, 2009). Les cellules de Paneth sont situées entre les cellules souches, fournissant ainsi les facteurs nécessaires à la croissance et au maintien des cellules souches, comme WNT3, un activateur de la voie proliférative par activation de la β -caténine (Sato *et al.*, 2011). Depuis, des avancées considérables ont été réalisées dans l'optimisation des conditions de culture permettant ainsi la croissance, l'expansion et la différenciation des cellules souches de plusieurs tissus différents (Sato *et al.*, 2011, McCracken *et al.*, 2014, Yin *et al.*, 2014, Dye *et al.*, 2015, Fatehullah *et al.*, 2016). En effet, des organoïdes ont été mis en culture et entretenus à partir de divers tissus, dont l'estomac (Bartfeld *et al.*, 2015), le cerveau (Lancaster *et al.*, 2013), le poumon (Nadkarni *et al.*, 2016) et le foie (Huch *et al.*, 2013). Un des avantages des organoïdes est de mieux refléter les caractéristiques tissulaires dans des conditions physiologiques normales, par opposition aux cellules croissant en 2D ou aux modèles sphéroïdes en 3D (Clevers, 2016, Dedhia *et al.*, 2016). Contrairement aux lignées cellulaires cancéreuses et normales en 2D, les organoïdes conservent toutes les caractéristiques spécifiques à la cellule épithéliale originale (van de Wetering *et al.*, 2015). Ces aspects font de la culture organoïde un modèle attrayant notamment pour la médecine personnalisée, car elle permet de tester des traitements existant ou expérimentaux sur des échantillons avec des signatures individuelles génomiques distinctes (Hynds et Giangreco, 2013, Barker, 2014). Les organoïdes apportent une nouvelle dimension dans les analyses avec l'opportunité d'étude des variations de l'expression des protéines, par des approches protéomiques utilisant des méthodes de spectrométrie de masse (Boj *et al.*, 2015) ou transcriptomique par des analyses RNA-seq (Drost *et al.*, 2015). Dans mes travaux, je vais compléter mes différents modèles, avec des analyses d'expression spécifique globale dans les CEI isolées de souris sans *Hdac1* et *Hdac2* dans l'épithélium, et avec des modèles d'entéroïdes en culture afin d'étudier le rôle intrinsèque des HDAC dans les CEI.

1.5. Hypothèse de recherche

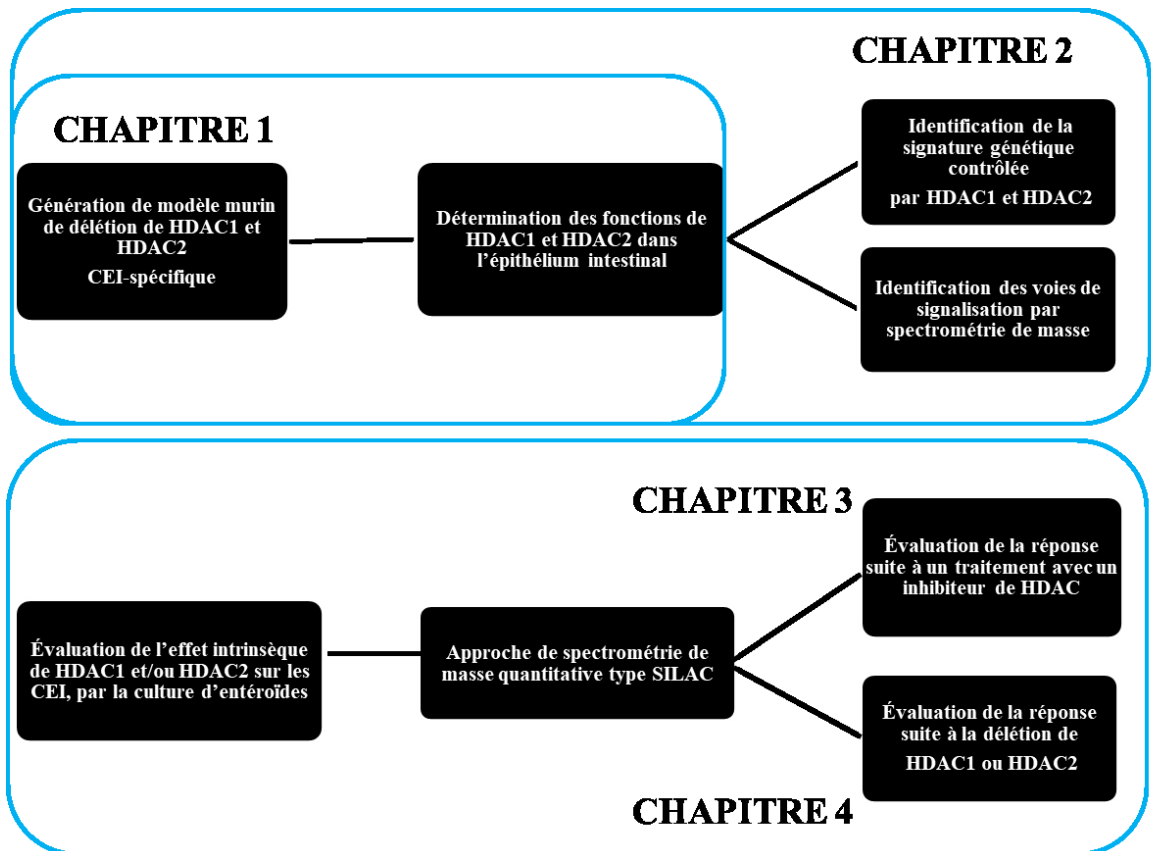
HDAC1 et HDAC2 sont des désacétylases majeures et ubiquitaires. Plusieurs études, dont les nôtres, ont rapporté des fonctions partagées de même que des fonctions spécifiques pour HDAC1 et HDAC2. Nous avons déjà montré que la perte de *Hdac1* et *Hdac2* dans l'épithélium intestinal à partir du jour E15 perturbe la différenciation et la prolifération des cellules, entraînant une inflammation chronique de la muqueuse et une sensibilité accrue à la colite induite par DSS. En revanche, la perte de *Hdac2*, tout en ne

modifiant pas l'homéostasie intestinale, protège contre la colite induite par le DSS. Ces résultats suggèrent que HDAC1 et HDAC2 ont des rôles semblables mais aussi différents, et que leurs niveaux d'activité peuvent mener à des phénotypes différents. De plus, nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si les phénotypes observés lors des délétions de ces HDAC dans les CEI sont dus à des effets intrinsèque ou à l'apport extrinsèque de l'environnement modifié de la muqueuse. Nous soumettons les hypothèses que 1) des différences dans les niveaux de HDAC1 et HDAC2, donc dans leur activité globale, mènent à des variations dans l'homéostasie intestinale, et que HDAC1 et HDAC2 ont des fonctions semblables, complémentaires et différentes; 2) des différences intrinsèques aux CEI, et dépendantes de HDAC1 et HDAC2, sont responsables des modifications globales de l'environnement de la muqueuse et 3) l'environnement de la muqueuse, modifié suite à l'absence de HDAC1 et de HDAC2 dans les CEI, peut supporter et/ou altérer les CEI. HDAC1 et HDAC2 pourraient donc agir à la fois comme senseurs épigénétiques de l'environnement et transmetteurs de signaux environnementaux sur l'homéostasie intestinale.

Pour répondre à cette hypothèse, je me suis fixé trois objectifs:

- I. Déterminer l'impact phénotypique de différents niveaux d'expression de HDAC1 et HDAC2 dans les CEI *in vivo* (Chapitre I) ;
- II. Identifier les fonctions spécifiquement contrôlées par HDAC1 et HDAC2 dans les CEI *in vivo*, par des approches transcriptomiques et protéomiques (Chapitre 2).
- III. Déterminer l'effet intrinsèque de HDAC1 et HDAC2 dans les CEI dans un modèle d'entéroïdes en culture par inhibition pharmacologique (Chapitre 3) ou génétique (Chapitre 4).

Afin de répondre à ces objectifs, j'ai suivi l'organigramme ci-après:



2. CHAPITRE 1

Avant-propos:

Titre: Distinct roles for Intestinal Epithelial Cell-Specific Hdac1 and Hdac2 in the Regulation of Murine Intestinal Homeostasis

Auteurs: Alexis Gonneaud ¶, Naomie Turgeon ¶, François Boudreau, Nathalie Perreault, Nathalie Rivard et Claude Asselin

¶ Co-premier auteur

Statut de l'article: publié

Journal: Journal of Cellular Physiology, Volume 231, Issue 2, Page 436-48, 2016

Contribution d'Alexis Gonneaud: 50%

J'ai participé à l'écriture du manuscrit (introduction, matériels et méthodes, résultats et discussion) et à la production des figures 7, 8, S4, S5, S7, S8, S9.

Résumé de l'article:

L'épithélium intestinal répond et transmet les signaux du microbiote et du système immunitaire de la muqueuse intestinale pour assurer l'homéostasie. Ces interactions sont en partie transmises par des modifications épigénétiques, qui répondent à des changements environnementaux. L'acétylation des protéines est un signal épigénétique régulé par les histone désacétylases comme HDAC1 et HDAC2. Nous avons déjà démontré que la délétion spécifique de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI perturbent l'homéostasie intestinale. Pour déterminer le rôle de HDAC1 et HDAC2 dans la régulation de la fonction des CEI et l'établissement du phénotype double mutant, nous avons généré des modèles murins Villine-Cre exprimant un allèle de *Hdac1* sans *Hdac2* ou un allèle de *Hdac2* sans *Hdac1*. Nous avons également étudié l'effet de la suppression à court terme de ces deux gènes chez les souris Ah-Cre inducibles par le β -naphthoflavone et les souris Villine-Cre^{ER} inducibles par le tamoxifène. Les souris avec un seul allèle de *Hdac1* présentaient une architecture tissulaire normale, mais une

sensibilité accrue à la colite induite par le DSS. En revanche, les souris avec un seul allèle de *Hdac2* présentaient des défauts d'architecture intestinale, une prolifération des CEI accrue, une diminution du nombre de cellules à mucus par opposition aux cellules de Paneth, une augmentation de l'infiltration de cellules immunitaires associées à la fibrose et une sensibilité accrue à la colite induite par le DSS. Par rapport aux souris doubles mutantes, nous avons observé une activation intermédiaire des voies de signalisation Notch, mTOR et STAT3. Alors que les délétions de *Hdac1* et *Hdac2* dans le modèle Villine-Cre^{ER} ont entraîné une détérioration de l'épithélium et des défauts de différenciation, la délétion médiée par le modèle Ah-Cre a entraîné une diminution de la prolifération dans les cryptes associée à l'induction d'une réponse aux dommages à l'ADN. Nos résultats suggèrent que la détermination des CEI et l'homéostasie intestinale dépendent fortement des niveaux d'activité de HDAC1 et de HDAC2 et que les changements dans l'acétylome de la CEI peuvent modifier l'environnement et la muqueuse.

Distinct roles for Intestinal Epithelial Cell-Specific Hdac1 and Hdac2 in the Regulation of Murine Intestinal Homeostasis

Alexis Gonneaud[¶], Naomie Turgeon[¶], François Boudreau, Nathalie Perreault, Nathalie Rivard and Claude Asselin*

Département d'anatomie et biologie cellulaire,
Pavillon de recherche appliquée sur le cancer,
Faculté de médecine et des sciences de la santé,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

[¶]These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to : Claude Asselin, Ph.D., Département d'anatomie et biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1E 4K8. Tel.: (819) 821-8000, ext 75276; Fax. : (819) 820-6831; E-mail: Claude.Asselin@USherbrooke.ca

Running head: **Hdac1 and 2 levels and intestinal homeostasis**

Keywords: **Hdac1, Hdac2, intestinal epithelial cell, determination, *Ah-Cre*, *Villin-Cre*, barrier function, DNA damage response, Notch, mTOR**

Total number of Figures: 8; Total number of Supplementary Figures: 9; Total number of Supplementary Tables: 1

Contract grant sponsor: Crohn and Colitis Canada

Abstract

The intestinal epithelium responds to and transmits signals from the microbiota and the mucosal immune system to insure intestinal homeostasis. These interactions are in part conveyed by epigenetic modifications, which respond to environmental changes. Protein acetylation is an epigenetic signal regulated by histone deacetylases, including Hdac1 and Hdac2. We have previously shown that *villin-Cre*-inducible intestinal epithelial cell (IEC)-specific *Hdac1* and *Hdac2* deletions disturb intestinal homeostasis. To determine the role of Hdac1 and Hdac2 in the regulation of IEC function and the establishment of the dual knockout phenotype, we have generated *villin-Cre* murine models expressing one *Hdac1* allele without *Hdac2*, or one *Hdac2* allele without *Hdac1*. We have also investigated the effect of short-term deletion of both genes in

naphthoflavone-inducible *Ah*-Cre and tamoxifen-inducible *villin*-Cre^{ER} mice. Mice with one *Hdac1* allele displayed normal tissue architecture, but increased sensitivity to DSS-induced colitis. In contrast, mice with one *Hdac2* allele displayed intestinal architecture defects, increased proliferation, decreased goblet cell numbers as opposed to Paneth cells, increased immune cell infiltration associated with fibrosis, and increased sensitivity to DSS-induced colitis. In comparison to dual knockout mice, intermediary activation of Notch, mTOR and Stat3 signaling pathways was observed. While *villin*-Cre^{ER} *Hdac1* and *Hdac2* deletions led to an impaired epithelium and differentiation defects, *Ah*-Cre-mediated deletion resulted in blunted proliferation associated with the induction of a DNA damage response. Our results suggest that IEC determination and intestinal homeostasis are highly dependent on Hdac1 and Hdac2 activity levels, and that changes in the IEC acetylome may alter the mucosal environment.

Introduction

The small intestine and the colon are covered by a layer of epithelial cells (IEC) which play key roles in intestinal homeostasis as transmitters, sensors and responders of environmental and mucosal immune signals (Asselin et Gendron, 2014). IEC lineages, including absorptive enterocytes, and secretory goblet, Paneth and enteroendocrine cells, derive from proliferating progenitor cells which themselves, emerge from crypt stem cells (Tetteh *et al.*, 2015). IEC maintenance, proliferation, and differentiation are regulated by many signal transduction pathways. For example, Notch signalling sustains stem cell generation and survival, and favors enterocyte differentiation, as opposed to secretory lineage commitment (Noah et Shroyer, 2013, Sancho *et al.*, 2015). The intestinal epithelium forms a physical barrier through tight junctions which keeps the luminal content at bay, and regulates intestinal permeability (Peterson et Artis, 2014). Specialized secretory cells form a chemical barrier as well. For example, goblet cells secrete mucins which cover the intestinal epithelium, produce antimicrobial proteins and prevent bacterial invasion (Johansson *et al.*, 2013). Paneth cells secrete antimicrobial proteins (Clevers et Bevins, 2013). By interacting with the luminal content, IEC participate in the initiation, maintenance and prevention of mucosal inflammation, in collaboration with other mucosal cells. Thus, intestinal homeostasis is insured by a reciprocal interaction between the intestinal mucosal system, including IEC, and the luminal environment, including diet-derived products, bacterial products and bacteria (Asselin et Gendron, 2014). However, modifications, either in the

environment or in the mucosal immune system, may alter homeostasis, leading to defects of intestinal inflammatory responses, among others (Khor *et al.*, 2011, Maloy et Powrie, 2011).

In recent years, epigenetic signals regulated by histone deacetylases (HDAC) have been implicated as important sensors of environmental changes (Alenghat et Artis, 2014, Asselin et Gendron, 2014). HDAC are enzymes that catalyse acetyl group removal from lysines on histones and non-histone proteins. Histone acetylation alters histone interactions with DNA or creates a mark recognized by bromodomain-containing transcriptional regulators (Filippakopoulos et Knapp, 2014). Acetylation alters DNA-protein and protein-protein interactions, as well as protein stability and localization of non-histone proteins (Choudhary *et al.*, 2014). Endogenous cellular metabolites, such as β -hydroxybutyrate (Shimazu *et al.*, 2013, Newman et Verdin, 2014), or bacterially-derived metabolites, such as butyrate (Delcuve *et al.*, 2012), act as HDAC inhibitors, thus regulating cellular acetylation levels. Of the 18 HDAC known, Hdac1 and Hdac2 are highly homologous nuclear class I deacetylases, with zinc-dependent activity (Kelly et Cowley, 2013). Hdac1 and Hdac2 are both catalytic subunits of multiprotein complexes such as Sin3A, CoREST and NuRD (Laugesen et Helin, 2014). Hdac1 and Hdac2 not only regulate transcription, but also DNA replication and repair (Moser *et al.*, 2014) (Noah et Shroyer, 2013).

The role of Hdac1 and Hdac2 has been assessed in murine models. While global *Hdac1* deletion results in embryonic death associated with reduced proliferation (Lagger *et al.*, 2002), *Hdac2* deletion leads to perinatal death from heart malformations (Montgomery *et al.*, 2007). Tissue-specific deficiencies of *Hdac1* or *Hdac2* lead to subtle phenotypic differences, in contrast to double gene deletion. Indeed, conditional deletion of both *Hdac1* and *Hdac2* in the epidermis is needed to impair epidermal proliferation and differentiation (LeBoeuf *et al.*, 2010). Likewise, deletion of both genes in B cells is needed to hinder B cell differentiation (Yamaguchi *et al.*, 2010). Recently, Hdac1 and Hdac2 gene-dosage dependence has been revealed in mouse models expressing only one allele of one gene in the absence of both alleles of the other. For example, brain development was altered in mice with one allele of *Hdac1* in neural cells, in contrast to mice with one *Hdac2* allele (Hagelkruys *et al.*, 2014). Mice with one allele of *Hdac2* in epidermal cells displayed impaired epidermal differentiation, in contrast to mice with one *Hdac1* allele (Winter *et al.*, 2013). Thus, mouse knockout studies suggest that Hdac1 and Hdac2 have both tissue-dependent

conserved as well as specific roles, and that tissue homeostasis is highly dependent on regulated levels of Hdac1 and Hdac2 activity.

In order to determine the role of Hdac1 and Hdac2 in the intestinal epithelium, we have previously generated IEC-specific *villin*-Cre murine models to delete both *Hdac1* and *Hdac2*. These mice displayed intestinal defects, including altered IEC proliferation and differentiation (Turgeon *et al.*, 2013). However, gene deletion was not complete, as heterogeneous expression of HDAC was observed. To uncover the specific roles of Hdac1 and Hdac2, we have produced *villin*-Cre models expressing only one allele of *Hdac1*, or one allele of *Hdac2*, and compared the phenotype to the one of dual knockout mice. We also verified the impact of short-term *Hdac1* and *Hdac2* deletion in adult mice, by using the naphthlavone-inducible *Ah*-Cre model and the tamoxifen-inducible *villin*-Cre^{ER} model. Our results show that intestinal homeostasis is exquisitely sensitive to *Hdac2* gene expression levels, as shown by the altered intestinal phenotype observed in mice with one IEC-specific *Hdac2* allele, in contrast to mice with one allele of *Hdac1*. We also show that DNA damage response and proliferation decreases are revealed after short-term deletion of both *Hdac1* and *Hdac2* in naphthlavone-inducible *Ah*-Cre mice, as opposed to tamoxifen-inducible *villin*-Cre^{ER} mice. These results suggest that Hdac1 and Hdac2 play specific roles in intestinal homeostasis, according to the mucosal environment. IEC determination and intestinal homeostasis are highly dependent on Hdac1 and Hdac2 activity levels. Changes in the IEC acetylome may alter the mucosal environment.

Materials and Methods

Villin-Cre mice

Conditional *Hdac1* and *Hdac2* floxed mice (Montgomery *et al.*, 2007) were crossed with *villin*-Cre transgenic mice (Madison *et al.*, 2002) to obtain mice with IEC-specific deletion of both *Hdac1* and *Hdac2* (*Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-}) (Turgeon *et al.*, 2013), of *Hdac1* (*Hdac1*^{-/-}), of one *Hdac1* allele without *Hdac2* (*Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-}) and one *Hdac2* allele without *Hdac1* (*Hdac2*^{+/-}*Hdac1*^{-/-}), in a mixed C57BL/6J X 129SV X CD1 genetic background. Mouse genotypes were determined from genomic DNA isolated with the Spin Doctor genomic DNA kit (Gerard Biotech, Oxford, OH), as described by Montgomery *et al.* (2007). Normal diet-fed mice were maintained in a pathogen free facility tested negative for *Helicobacter*, *Pasteurella* and murine norovirus. One-month-old or three- to four-month-old mice were used for the different experiments. Animal

investigations were authorized by the Institutional Animal Research Review Committee of the Université de Sherbrooke (protocol 360-14B).

Inducible murine knockout models

Conditional *Hdac1* and *Hdac2* floxed mice (Montgomery *et al.*, 2007) were crossed with *Ah*-Cre transgenic mice (Ireland *et al.*, 2004). These mice express a Cre recombinase under the control of the cytochrome P450 promoter regulated by the Ah receptor, in response to xenobiotics (Labrecque *et al.*, 2013). Two- to three-month-old mice were injected intraperitoneally with 80 mg/kg β -naphthoflavone suspended in corn oil, for four consecutive days. Mice were then killed on day 7 or 8 after the initial injection. Conditional *Hdac1* and *Hdac2* floxed mice were also crossed with *villin*-Cre^{ER} transgenic mice, which are inducible by tamoxifen (el Marjou *et al.*, 2004). Two- to three-month-old mice were injected intraperitoneally with 1 mg tamoxifen suspended in ethanol and corn oil, for five consecutive days (Feil *et al.*, 2009). Mice were killed on the sixth day.

Electron microscopy

Jejunal segments from *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-}, *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-}, *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} and control mice were prepared for ultramicrotome-prepared thin sectioning, and were observed on a Jeol 100 CX transmission electron microscope, as previously described (Boudreau *et al.*, 2007).

Histological analysis, immunofluorescence and immunocytochemistry

Jejunal, colonic and gastric tissues were fixed in 4% paraformaldehyde before enclosing in paraffin (Turgeon *et al.*, 2013, Turgeon *et al.*, 2014). 5 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin for histological analysis, with Alcian blue or Periodic Acid Schiff for goblet cell mucins, with Best's Carmine for Paneth cells, with Naphtol-AS-D chloroacetate (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) for granulocyte esterase activity, or with Masson's trichrome reagent for collagen. For immunofluorescence experiments, sections were rehydrated with graded ethanol series containing 100, 95, 80 and 70% xylene, and then boiled for 6 min in 10 mM citric acid. After blocking in a PBS solution supplemented with 0.1% BSA and 0.2% Triton for 45 min, sections were incubated with the following antibodies: goat anti-sucrase isomaltase and goat anti-lysozyme (1:250, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-PCNA as a proliferation marker (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti- γ -H2AX (1:500, Santa Cruz

Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-proton transporter (1:500, MBL International, Woburn, MA, USA), rabbit anti-HDAC1 and rabbit anti-HDAC2 (1:600, Abcam Inc., Toronto, ON, Canada). Primary antibodies were recognized with secondary Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H + L), 555 donkey anti-goat IgG (H + L) or 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (Life Technologies Inc, Burlington, ON, Canada) by incubating for 2 h at room temperature. Immunocytochemistry was done with primary rabbit anti-CD3 for T cell staining (1:200, Dako Canada Inc., Burlington, ON, Canada), followed by labelling with EnVision+System-HRP (Dako Canada Inc., Burlington, ON, Canada). Additional information about the antibodies used is included in Supplementary Table 1.

In vivo migration assay

10 ml/kg of bromodeoxyuridine (BrdU, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) were injected intraperitoneally for 48 h, to assess IEC jejunal migration. Immunofluorescence staining of intestinal sections was done as described before, with a 1:50 dilution of a mouse antibody against BrdU (AB BMC 9318, Roche Diagnostics, Mississauga, ON, Canada) incubated 45 min at 37°C (Turgeon *et al.*, 2013). A migration index was established by measuring the average distance between migrating cells and the crypt and by comparing this value with the total length of the crypt-villus axis. Additional information about the BrdU antibody is included in Supplementary Table 1.

In vivo permeability assay

Intestinal permeability was determined after giving 60 mg/100 g body weight of 4-kDa Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-labeled dextran (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) by gavage. After 3 h, mice were killed, and FITC serum concentrations from recovered blood were determined with a RF-5301 PC spectrofluorophotometer (490/525 nm) (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA), as we have done before (Turgeon *et al.*, 2013, Turgeon *et al.*, 2014).

Western blot analysis

Control and conditionally mutated murine colons were recovered (Tissuelyser, Qiagen, Montreal, QC, Canada) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 5% glycerol, 40 mM β -glycerophosphate supplemented with protease inhibitors, 50 mM NaF and 200 mM Na_3VO_4 . Protein concentrations were measured by the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). 30 μg of total protein extracts were

loaded on 10% or a 15% SDS-polyacrylamide gels and electroblotted on a PVDF membrane (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada). Membranes were incubated for 1 h at ambient temperature or overnight at 4°C, with the following primary antibodies: mouse anti-actin (Millipore, Billerica, MA, USA); rabbit anti-phosphoS6 ribosomal protein, rabbit anti-phosphoStat3 and rabbit anti-Stat3, rabbit anti-cleaved Notch1 (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada); rabbit anti-claudin 3 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Additional information about the antibodies used is included in Supplementary Table 1.

DSS colitis model

Colitis was induced in three- to four-month-old wild-type and conditionally mutated mice by adding 3.5% dextran sulfate sodium (DSS) (MW 40-50 kD) to the drinking water for five days *ad libitum*. Colitis intensity was monitored clinically with a Disease Activity Index based on body weight, colon length, stool consistency and the presence of fecal blood (Cooper *et al.*, 1993).

Statistical analysis

Statistical analyses were calculated with the Student t-test with the non-parametric Mann-Whitney U test or with one-way ANOVA with Holm-Sidak test for multiple comparisons (GraphPad Prism 5 software, Irvine, CA, USA). Differences were considered significant at * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$ or **** $p \leq 0.001$. P values between 0.05 and 0.1 are indicated. Error bars indicate the SEM. The criterion to reject outlier points was if their values were greater than four standard deviations than the mean of the remaining points of their group.

Results

In a previous study, we have observed that specific IEC deletion of *Hdac1* and *Hdac2* led to homeostatic defects including tissue architecture abnormalities, Paneth and goblet cell deficiencies and chronic intestinal inflammation (Turgeon *et al.*, 2013). These mice showed patchy Hdac expression, suggesting that some levels of HDAC activity are needed to insure intestinal development. In addition, while IEC-specific *Hdac2* deletion in mice did not alter intestinal architecture, *Hdac2* IEC-depleted mutant mice displayed decreased sensitivity to dextran sulfate (DSS)-induced colitis, correlating with select variations of gene expression in IEC-specific *Hdac2*-depleted mice (Turgeon *et al.*, 2014). However, IEC-specific *Hdac1*-depleted mice did not alter intestinal homeostasis. Indeed, in comparison to control mice, there was no change in

mutant *Hdac1*^{-/-} mice weight (Suppl. Fig. 1A), colon and small intestine length and weight (Suppl. Fig. 1B-C), villus and crypt length (Suppl. Fig. 1D), proximal and distal colon crypt length (Suppl. Fig. 1E) and numbers of goblet and Paneth cells (Suppl. Fig. 1F-G).

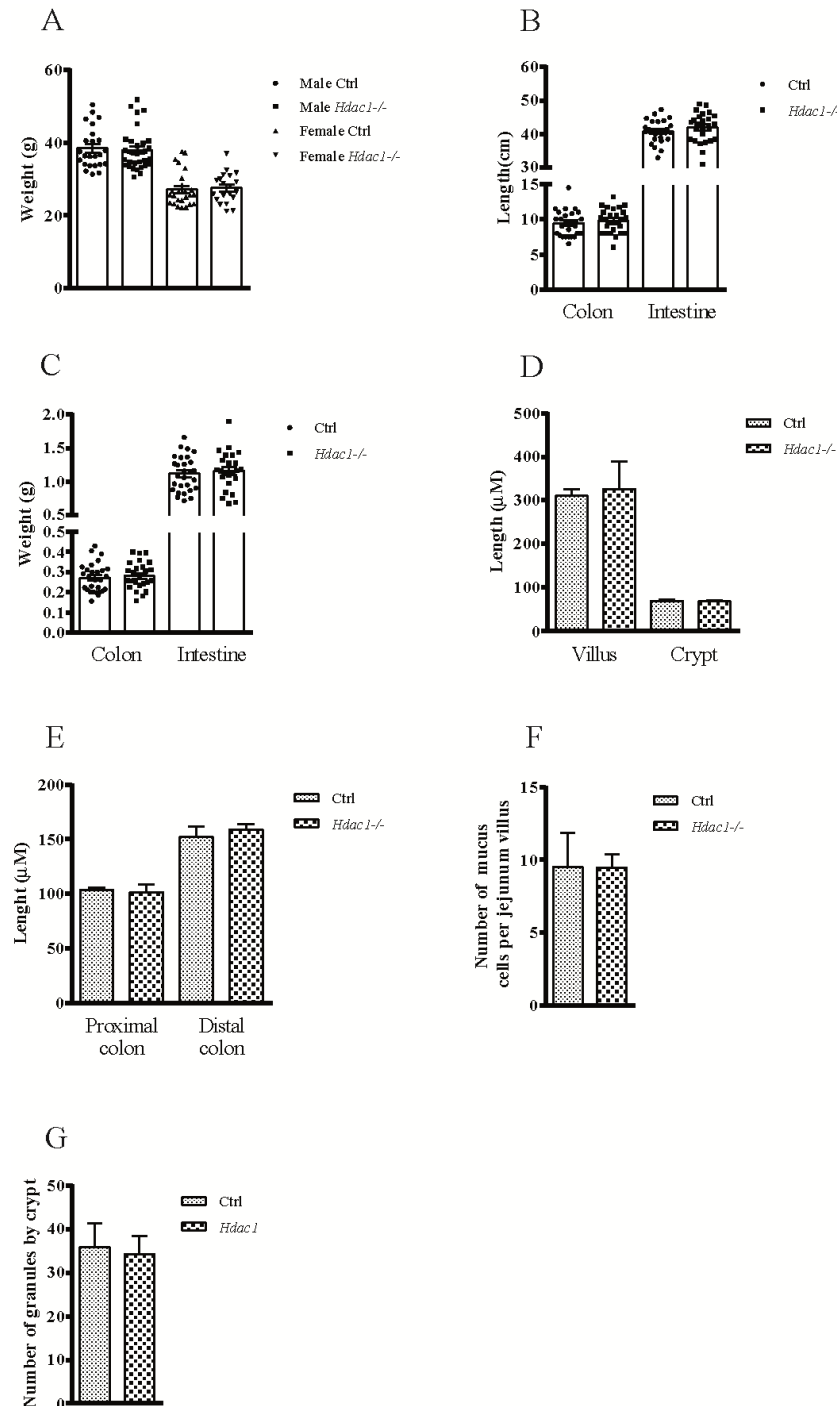


Figure 6 Supplementary Figure 1. Conditional intestinal epithelial *Hdac1* deletion does not alter significantly intestinal homeostasis. Body weight (A, n= 20-30), colon and small intestine length (B, n= 26-28) and weight (C, n= 26-28), jejunal villus and crypt length (D, n= 3-4), proximal and distal colon length (E, n= 4), goblet cell (F, n=

2) and Paneth cell numbers, as assessed by granule numbers per crypt (G, n= 2), of *villin*-Cre conditional intestinal epithelial *Hdac1*-deficient mice, in comparison to control (Ctrl) mice, were measured. The histograms show the means \pm SEM (Student's *t*-test, * $p \leq 0.05$).

Hdac1^{-/-} mutant jejunum and colon did not display intestinal architecture defects, as assessed by hematoxylin and eosin staining (Suppl. Fig. 2A-B). In contrast to IEC-specific *Hdac2*-depleted mice, IEC-specific *Hdac1* knockout mice were as sensitive as wild-type mice to DSS-induced colitis, as determined by the Disease Activity Index (DAI) based on body weight, colon length, stool consistency and the presence of fecal blood (Suppl. Fig. 2C).

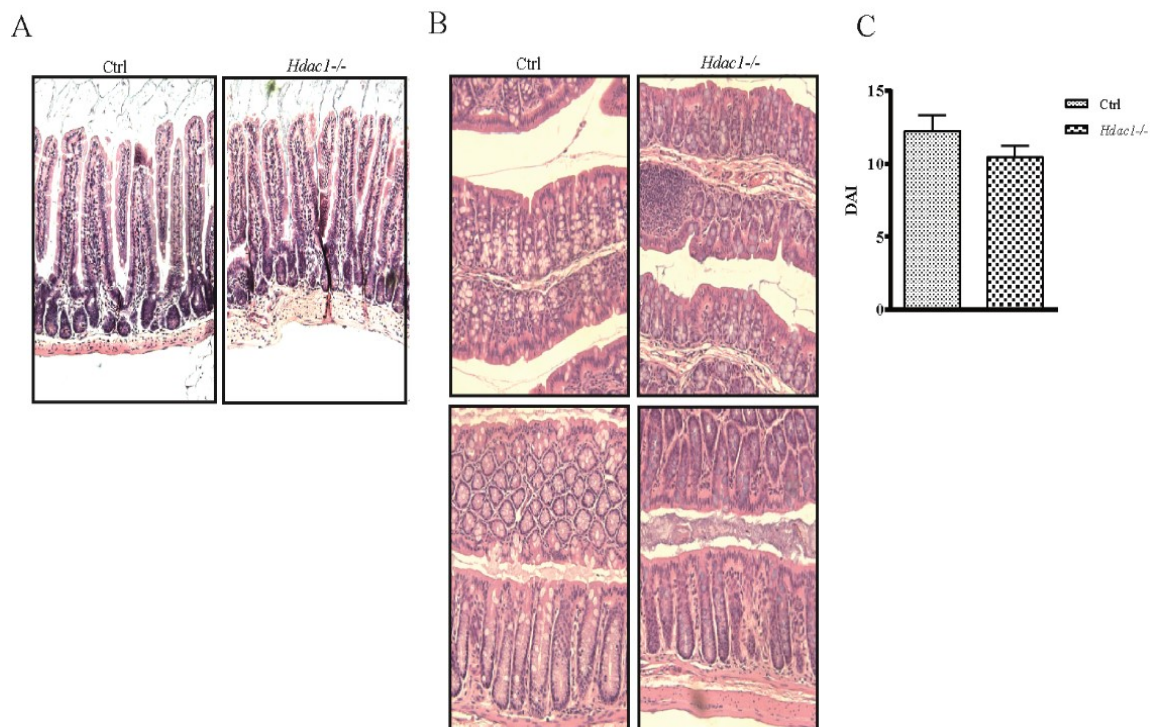
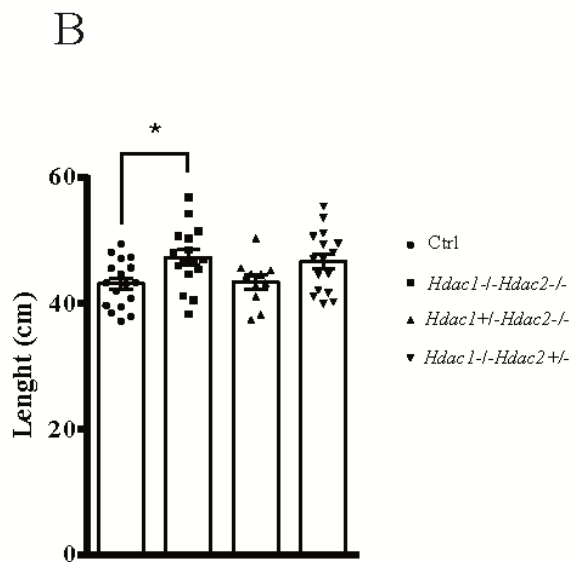
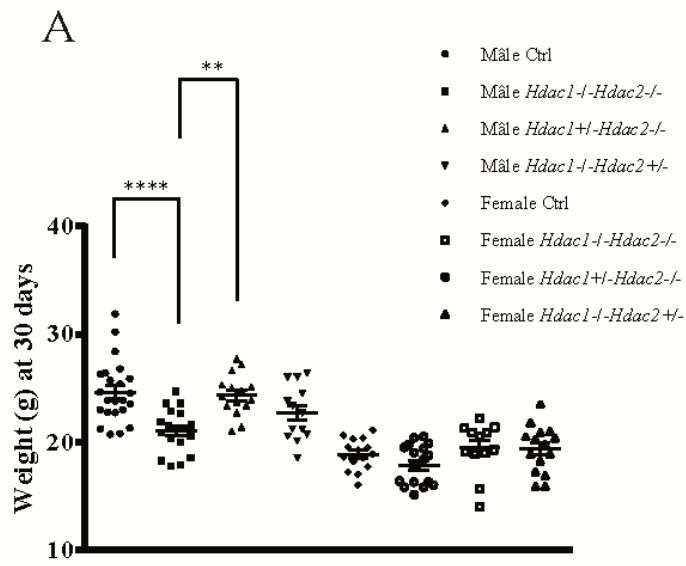


Figure 7 Supplementary Figure 2. Conditional intestinal epithelial *Hdac1* deletion does not alter significantly intestinal homeostasis. Tissue sections from representative control (Ctrl) and *villin*-Cre conditional intestinal epithelial *Hdac1*^{-/-} jejunum (A), proximal (upper panel) and distal (lower panel) colon (B) were stained with hematoxylin and eosin. C. The Disease Activity Index (DAI) of control (Ctrl) and IEC-specific *Hdac1*-deficient mice, treated without or with DSS for seven days, was measured (n= 22-29). The histograms show the means \pm SEM (Student's *t*-test, * $p \leq 0.05$).

Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-} and Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-} mutant mice display intestinal ultrastructural defects

These data suggested that *Hdac1* and *Hdac2* play convergent as well as divergent roles in the control of intestinal homeostasis. However, the relative importance of *Hdac1* in relation to *Hdac2* in the regulation of intestinal homeostasis remained to be determined. We thus hypothesized that additional reduction of *Hdac1* and/or *Hdac2* expressions could reveal the disturbed homeostatic phenotype observed in mice deleted for both *Hdac1* and *Hdac2* in the intestinal epithelium, and that those different thresholds could lead to different homeostatic responses. To answer this, we first generated IEC-specific murine models expressing one allele of *Hdac1* in an *Hdac2* double knockout background (*Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}*), or one allele of *Hdac2* in an *Hdac1* double knockout background (*Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}*). We compared mouse phenotypes to control as well as to dual *Hdac1* and *Hdac2* knockout mice (*Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}*).

Thirty-day-old *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* and *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* IEC-deficient mice did not display decreased body weight nor increased small intestine length, as opposed to *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* mice (Suppl. Fig. 3A-B). However, colon and small intestine weight was increased in dual knockout mice and in mice with one allele of *Hdac2*, in contrast to mice with one allele of *Hdac1* (Suppl. Fig. 3C).



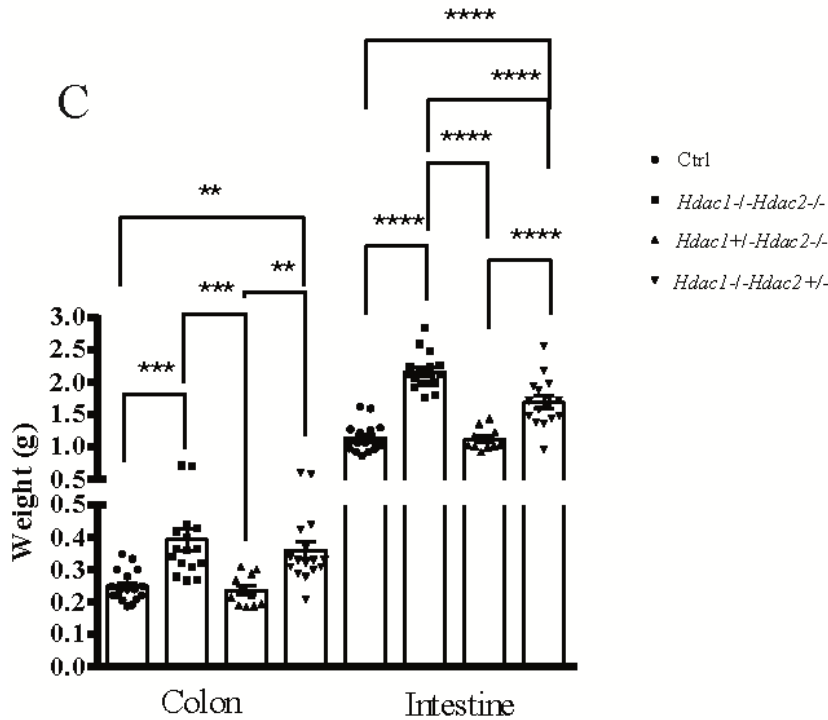


Figure 8 Supplementary Figure 3. Mice with one allele of IEC *Hdac2* display increased colon and small intestine length. A. Thirty-day-old control (Ctrl) (n= 23, 16), dual *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} (n= 18, 18), *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} (n= 15, 12) and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} (n= 13, 15) male and female mice were weighed. **B.** Small intestine length of three-month-old control (Ctrl) (n= 17), dual *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} (n= 16), *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} (n= 11) and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} (n= 16) mutant mice was measured. **C.** Colon and small intestine weight of three-month-old control (Ctrl) (n= 17, 15), dual *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} (n= 16, 16), *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} (n= 11, 17) and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} (n= 16, 16) mutant mice was measured. Results represent the means \pm SEM (*p \leq 0.05; ** p \leq 0.01; *** p \leq 0.005; **** p \leq 0.001).

Control mice and mice with only one *Hdac1* allele in the epithelium showed well marked and basally ordered nuclei in the jejunal and colonic epithelia, as determined by hematoxylin and eosin staining (Fig. 1A, B). In contrast, altered staining and localization of IEC nuclei and presence of disordered cells with apparent loss of polarity were observed in jejunal sections of mice with one allele of *Hdac2* and in dual knockout mice (Fig. 1A). The same defects were observed in colonic sections of both *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} IEC-specific mutant mice (Fig. 1B). Thus, in contrast to *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} mutant mice, *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-}

mutant jejunum and colon did not display apparent modifications of tissue and cell architecture, as in wild-type murine jejunum and colon.

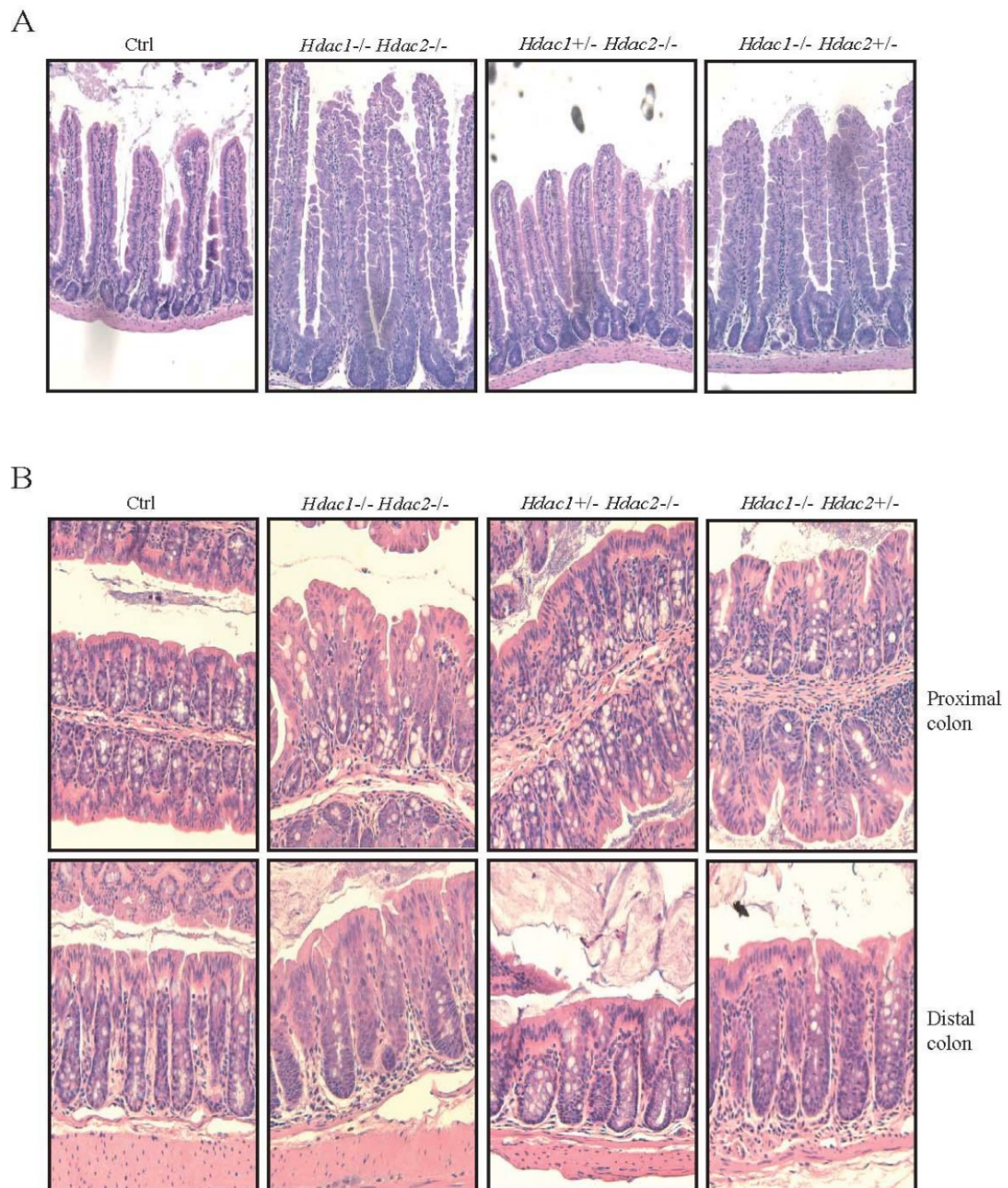


Figure 9 Figure 1. One allele of IEC-specific *Hdac2* is insufficient to maintain normal intestinal architecture. Three-month-old control (Ctrl), *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-}, *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} jejunal (**A**) and colonic (**B**) tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Magnification of representative tissue sections: 20 X.

Based on these data, we then analysed *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} IEC ultrastructure by electron microscopy. Dual *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} mutant jejunal cells (Suppl. Fig. 4A) were characterized by shorter and larger villusities, as opposed to control (Suppl. Fig. S4B) and *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} mutant jejunal cells (data not shown). In addition, *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} jejunal cells featured increased presence of vacuoles and lysosome-like structures (Suppl. Fig. 4A-C), in comparison to control cells (Suppl. Fig. 4B), as well as increased numbers of mitochondria (Suppl. Fig. 4D) and endoplasmic reticulum (Suppl. Fig. 4E).

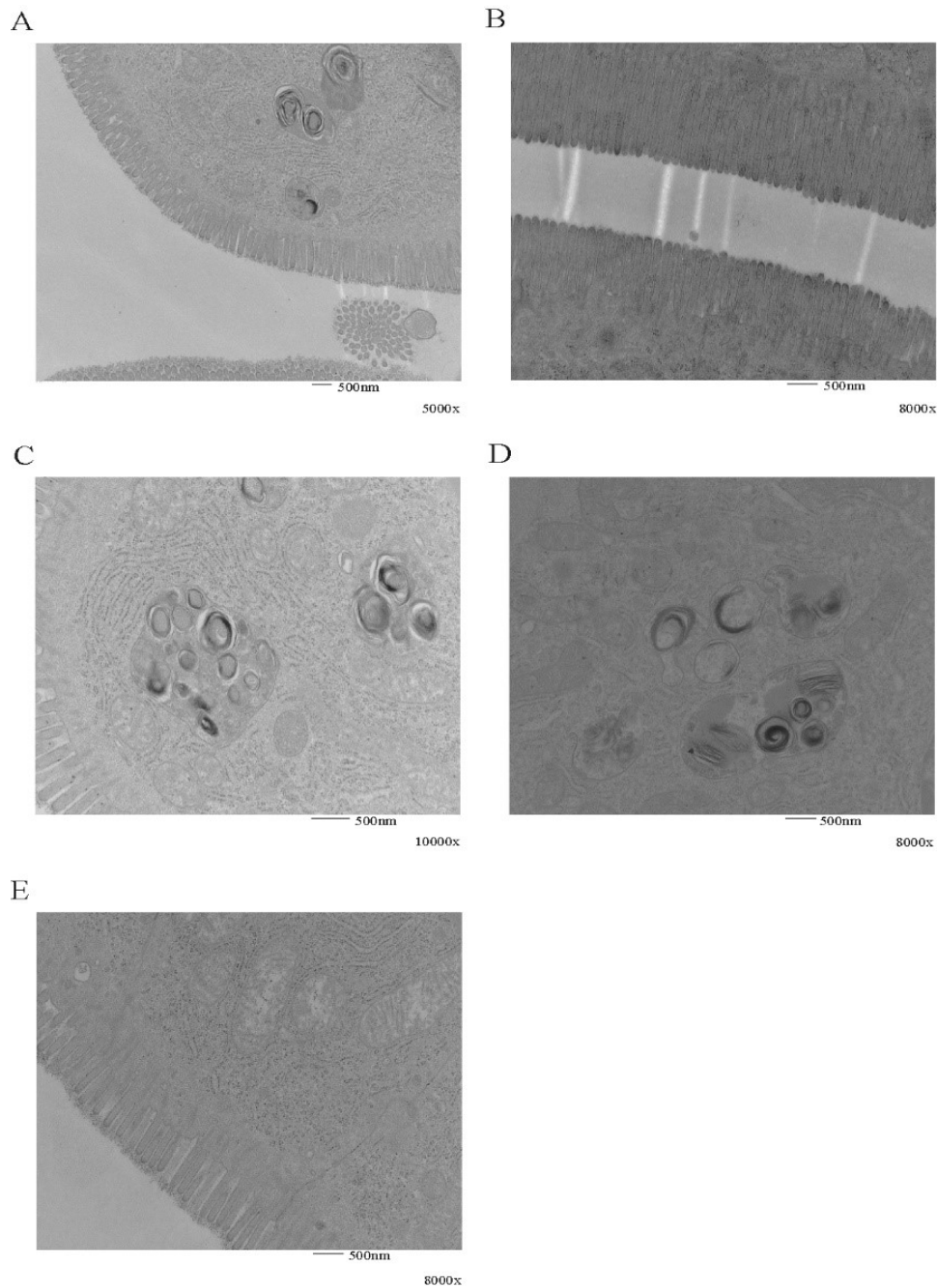


Figure 10 Supplementary Figure 4. Microscopic analysis of dual *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} jejunal cells. Representative micrographs of *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} jejunal cells (**A, C, D, E**) and control jejunal cells (**B**) are shown. The scale bar indicates the relative size.

Electron microscopy analysis confirmed the reduction in the number of Paneth and goblet cells (Turgeon *et al.*, 2013). The occasional goblet and Paneth cells that we observed presented a normal ultrastructural appearance. Jejunal cells from mice with one epithelial allele of *Hdac2* (*Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-}) displayed typical villus length and width (compare Suppl. Fig. 5A vs 4B) and normal Paneth cell architecture with granules (Suppl. Fig. 5B), as well as increased numbers of mitochondria and lysosome-like structures were observed (Suppl. Fig. 5C-D). In addition, electron microscopy analysis showed a decrease in goblet cell numbers as opposed to Paneth cell numbers. Thus, in contrast to mice with one allele of *Hdac1*, mice with one allele of *Hdac2* displayed intermediate IEC ultrastructural defects in comparison to dual *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} mice.

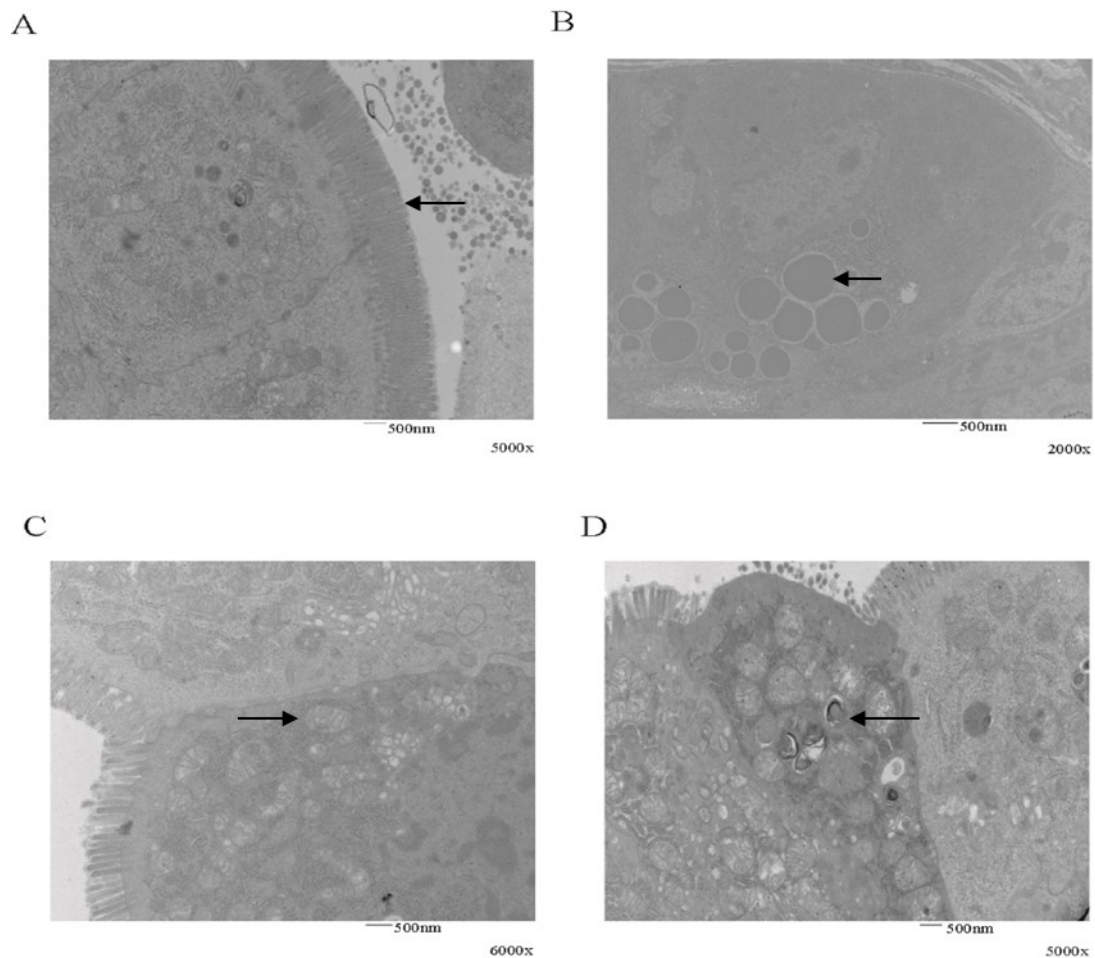


Figure 11 Supplementary Figure 5. Microscopic analysis of dual *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} jejunal cells. Representative micrographs of *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} jejunal cells (A, B, C, D) are shown. The scale bar indicates the relative size.

One allele of IEC-specific Hdac2 is insufficient to maintain proper intestinal homeostasis

To determine the state of proliferation, we stained jejunal tissue sections with an antibody against PCNA. Proliferation was significantly increased in jejunal segments of dual *Hdac1* and *Hdac2* knockout mice and in mice with one allele of *Hdac2* ($p=0.052$), but not *Hdac1* ($p=0.895$) (Fig. 2A, B). To assess cell migration in the jejunum, we injected mice with BrdU for 48 h, and stained jejunal sections with an antibody against incorporated BrdU. *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} IEC-specific mice did not show significant increases in migration rate ($p=0.11$; $p=0.099$), as opposed to dual knockout mice (Fig. 2C, D).

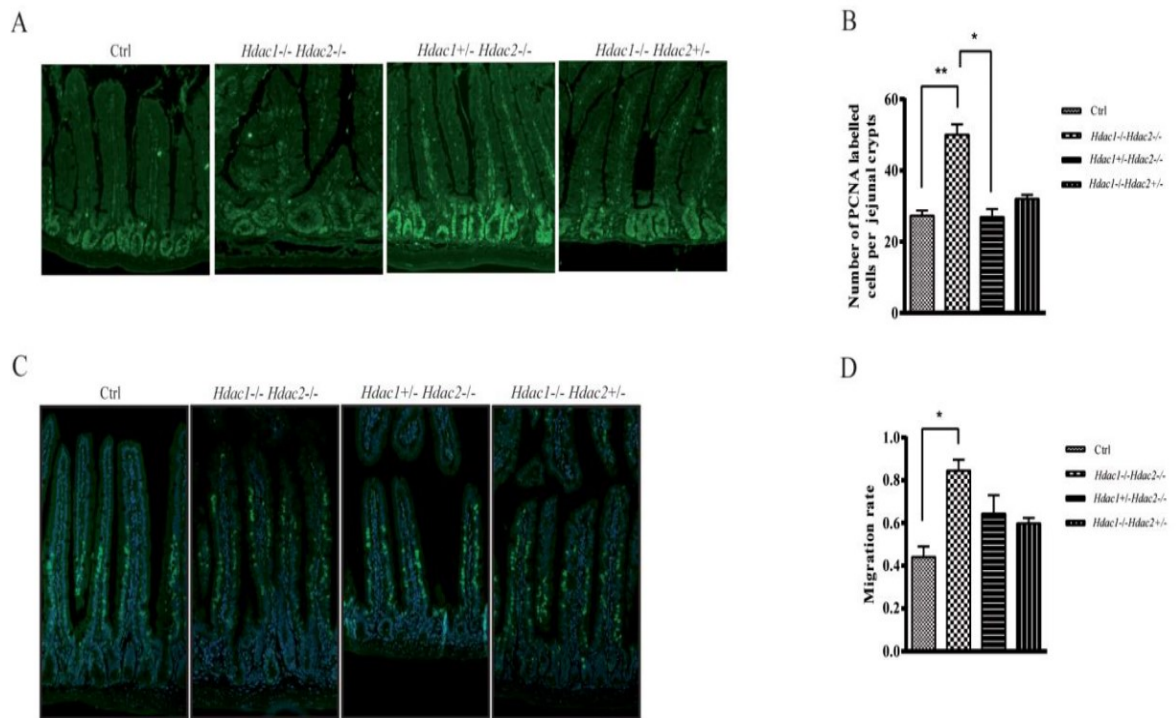


Figure 12 Figure 2. IEC proliferation and migration are differently regulated in mice with one allele of *Hdac1* or *Hdac2*. Jejunal tissue sections from three-month-old control, *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-}, *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} IEC-specific mutant mice were stained with an antibody against PCNA (A). Jejunal PCNA-labeled cells were counted to assess proliferation ($n=4-6$, 20 to 30 crypts or glands each) (B). C. BrdU-labeled jejunal sections were stained with an antibody against BrdU in order to

measure the migration distance (n= 2-4, 20 to 40 villi each) (**D**). Results are expressed as the means \pm SEM (one-way Anova test, *p \leq 0.05; ** p \leq 0.01). Magnification of representative tissue sections: 20 X.

We then verified whether mice with single *Hdac1* or *Hdac2* alleles displayed determination defects. Alcian blue staining showed decreased goblet cell numbers in the jejunum (Fig. 3A, B) and proximal colon (Fig. 3C, D) of dual knockout mice and of mice with one allele of *Hdac2*, in contrast to control mice and mice with one allele of *Hdac1*.

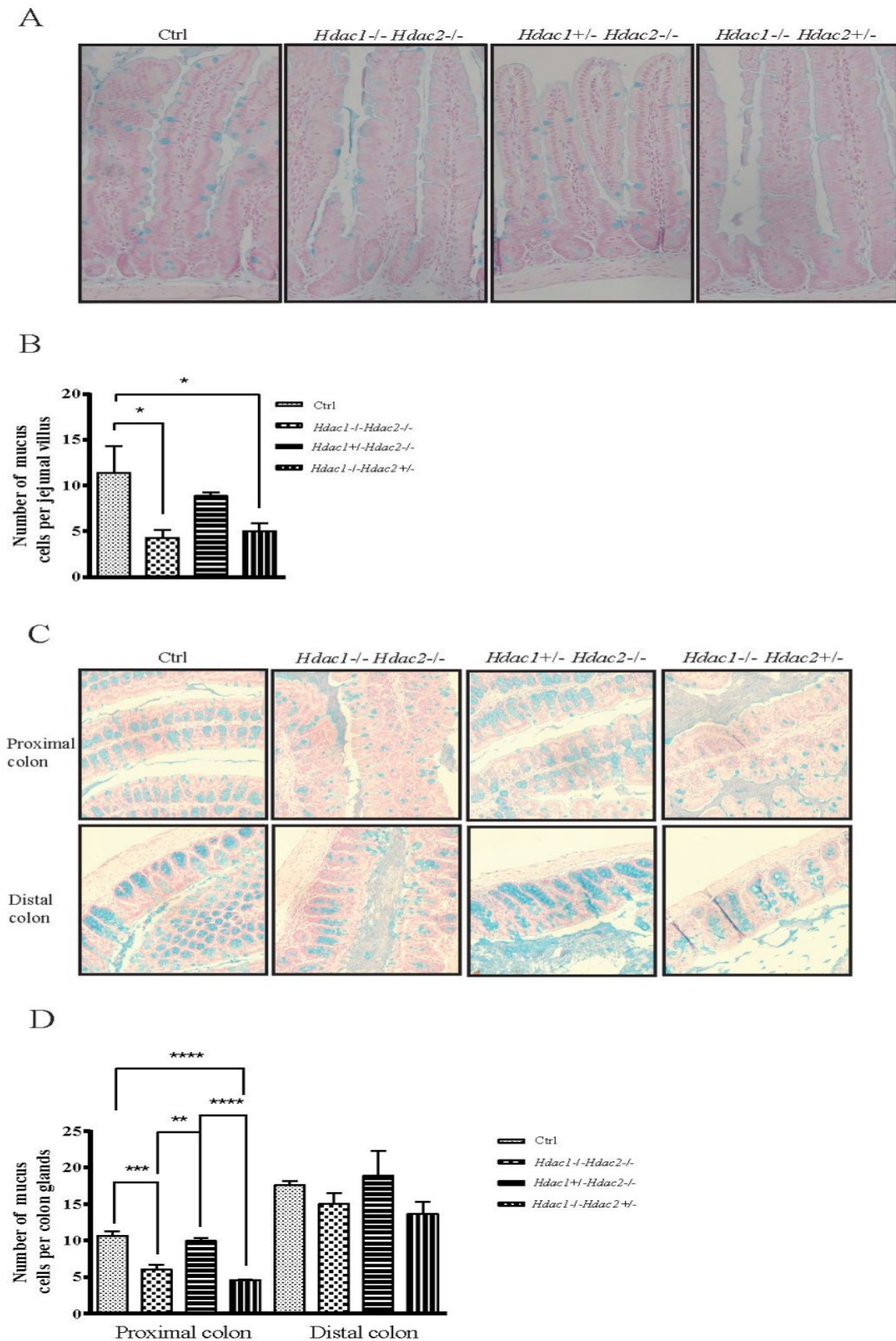
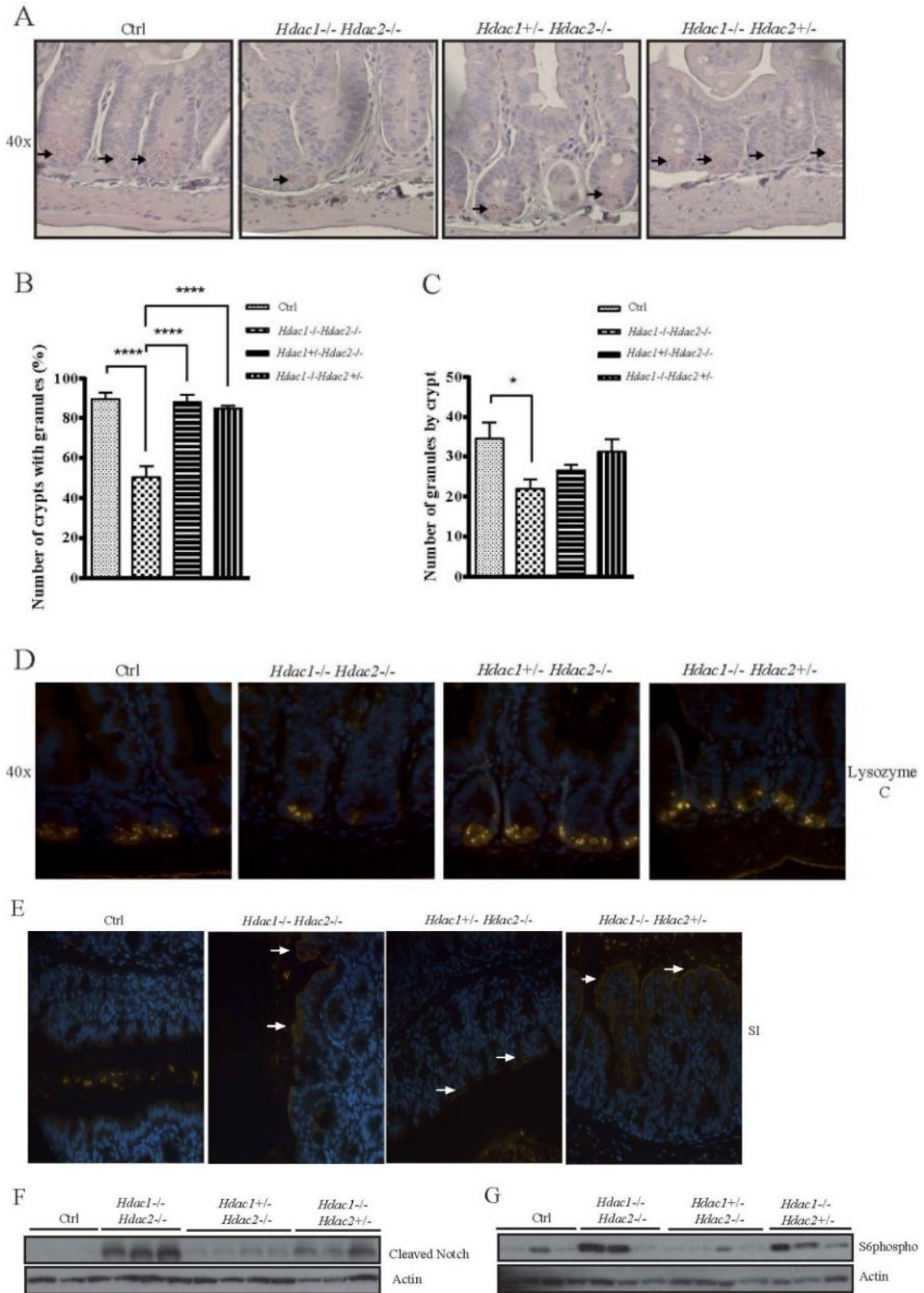


Figure 13 Figure 3. One allele of IEC-specific *Hdac2* is insufficient to maintain proper goblet cell determination. Jejunal (A), proximal and distal colonic (C) tissue sections from three-month-old control, *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-}, *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}

Hdac2^{+/-} IEC-specific mutant mice were stained with Alcian blue. The number of Alcian blue-stained cells in jejunal villi (**B**) or in proximal and distal colonic glands (**D**) were counted (n= 3-5). Results are expressed as the means \pm SEM (one-way Anova test, *p \leq 0.05; ** p \leq 0.01; *** p \leq 0.005; **** p \leq 0.001). Magnification of representative tissue sections: 20 X.

Paneth cell numbers were maintained in mutant murine jejunum with one allele of *Hdac1* or *Hdac2*, in contrary to a decrease in dual knockout mice, as assessed by staining of Paneth cells with Best Carmine (Fig. 4A) or with an antibody against the Paneth cell marker lysozyme (Fig. 4D). This was confirmed by a specific reduction in the number of crypts with granules (Fig. 4B) and the number of granules per crypts (Fig. 4C) only in dual knockout mouse jejunum. Thus, one allele of *Hdac2* was not sufficient to maintain goblet cell determination, as opposed to Paneth cell determination, while one allele of *Hdac1* maintained proper secretory IEC determination. Intriguingly, stochastic apical expression of sucrase-isomaltase, an enterocyte protein exclusively expressed in the small intestine, was observed not only in murine colons of dual knockout and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} mice, but also in *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} mutant mice, as assessed by immunofluorescence (Fig. 4E, arrows). We then verified the expression of cleaved Notch, which regulates negatively secretory cell determination and positively enterocyte differentiation (Noah et Shroyer, 2013, Sancho *et al.*, 2015), and of phosphorylated S6 protein, a marker of mTOR signalling pathway activity (Laplante et Sabatini, 2012), by Western blot analysis of mutant colonic tissue extracts. Mutant colonic tissue extracts displayed different levels of cleaved Notch and phosphorylated S6, with higher expression in dual knockout mice, intermediate expression in *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} mice and lower expression in *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} mutant mice (Fig. 4F, G). Thus, different thresholds of Hdac activity may lead to different levels of Notch activation, resulting in specific secretory cell phenotypes.



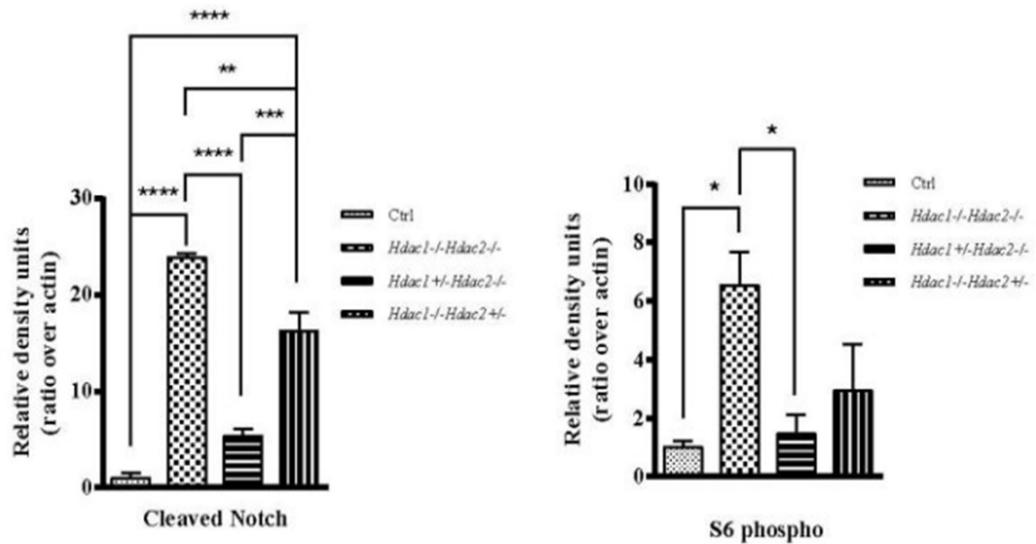
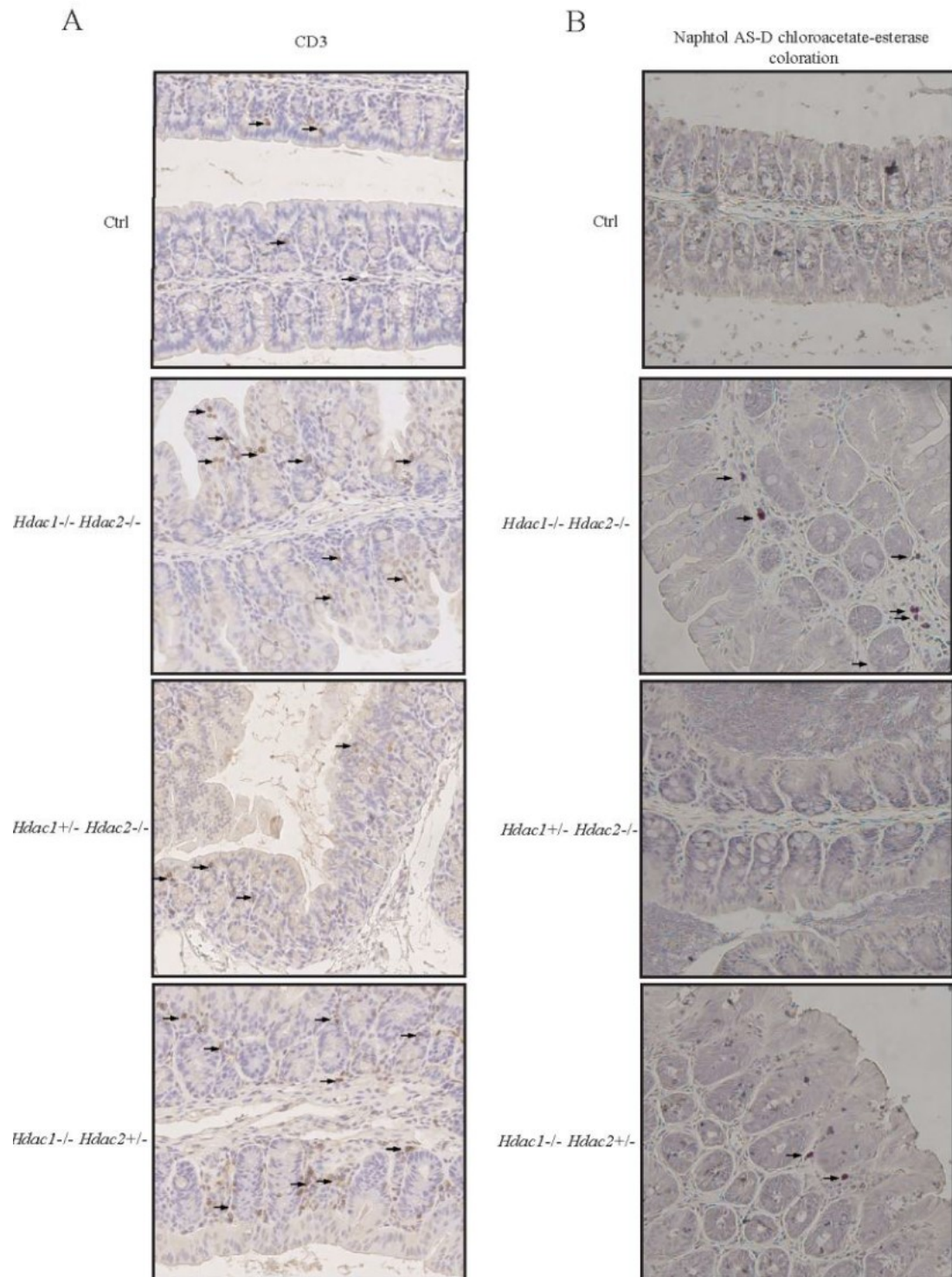


Figure 14 Figure 4. One allele of IEC-specific *Hdac2* or *Hdac1* is sufficient to maintain proper Paneth cell determination. Jejunal tissue sections from three-month-old control, *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}*, *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* IEC-specific mutant mice were stained with Best Carmine (A) or with an antibody against lysozyme (D). The number of crypts with granules (B) or the number of granules per crypts (C) were counted (n= 3-5, 40 crypts each). Results are expressed as the means \pm SEM (one-way Anova test, *p \leq 0.05; **** p \leq 0.001). Magnification of representative tissue sections: 40 X. E. Colonic tissue sections from three-month-old control, *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}*, *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* IEC-specific mutant mice were stained with an antibody against sucrase-isomaltase. Magnification of representative tissue sections: 40 X. F, G. Total colonic protein extracts were separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes for Western blot analysis of cleaved Notch (F), phosphorylated S6 (G) and actin expression. The histograms represent the ratio of band intensities normalized to actin. Quantification of band intensity was done with the Image J software. Results are expressed as the means \pm SEM (one-way Anova test, *p \leq 0.05; ** p \leq 0.01; *** p \leq 0.005; **** p \leq 0.001).

Hematoxylin and eosin staining suggested increased immune cell recruitment in *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* IEC-specific mutant jejunum and colon (Fig. 1). Indeed, T cell recruitment was increased in both *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* IEC-specific mutant colonic mucosa, as evidenced by CD3 antibody staining (Fig. 5A). A trend for increased recruitment of granulocytes, as assessed by staining of esterase-expressing cells with Naphtol AS-D chloroacetate, was noted as well (Fig. 5B, C).



C

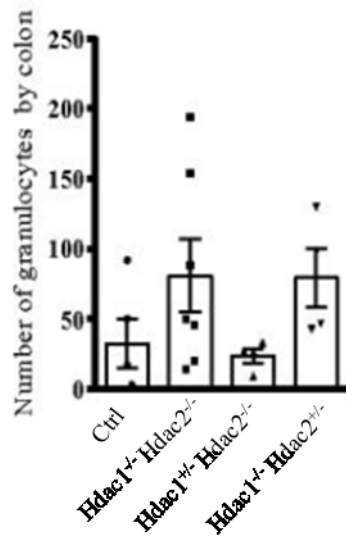


Figure 15 Figure 5. Mice with one allele of IEC-specific *Hdac2* exhibit increased immune cell recruitment. Colonic tissue sections from three-month-old control (Ctrl), *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-}, *Hdac1*^{+/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} IEC-specific mutant mice were stained with an antibody against CD3 for T cells (A) or subjected to Naphtol AS-D chloroacetate-esterase coloration for granulocytes (B). Stained T cells and granulocytes are indicated by arrows. C. The number of Naphtol AS-D chloroacetate-esterase-stained granulocytes in B were counted (n= 4-7). Magnification of representative tissue sections: 20 X

In addition, some *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} mutant mice displayed hardened colons, suggesting intestinal fibrosis. Masson's trichrome staining revealed increased collagen deposits in the colons of dual deficient mice as well as of mice with one allele of *Hdac2* (Suppl. Fig. 6).

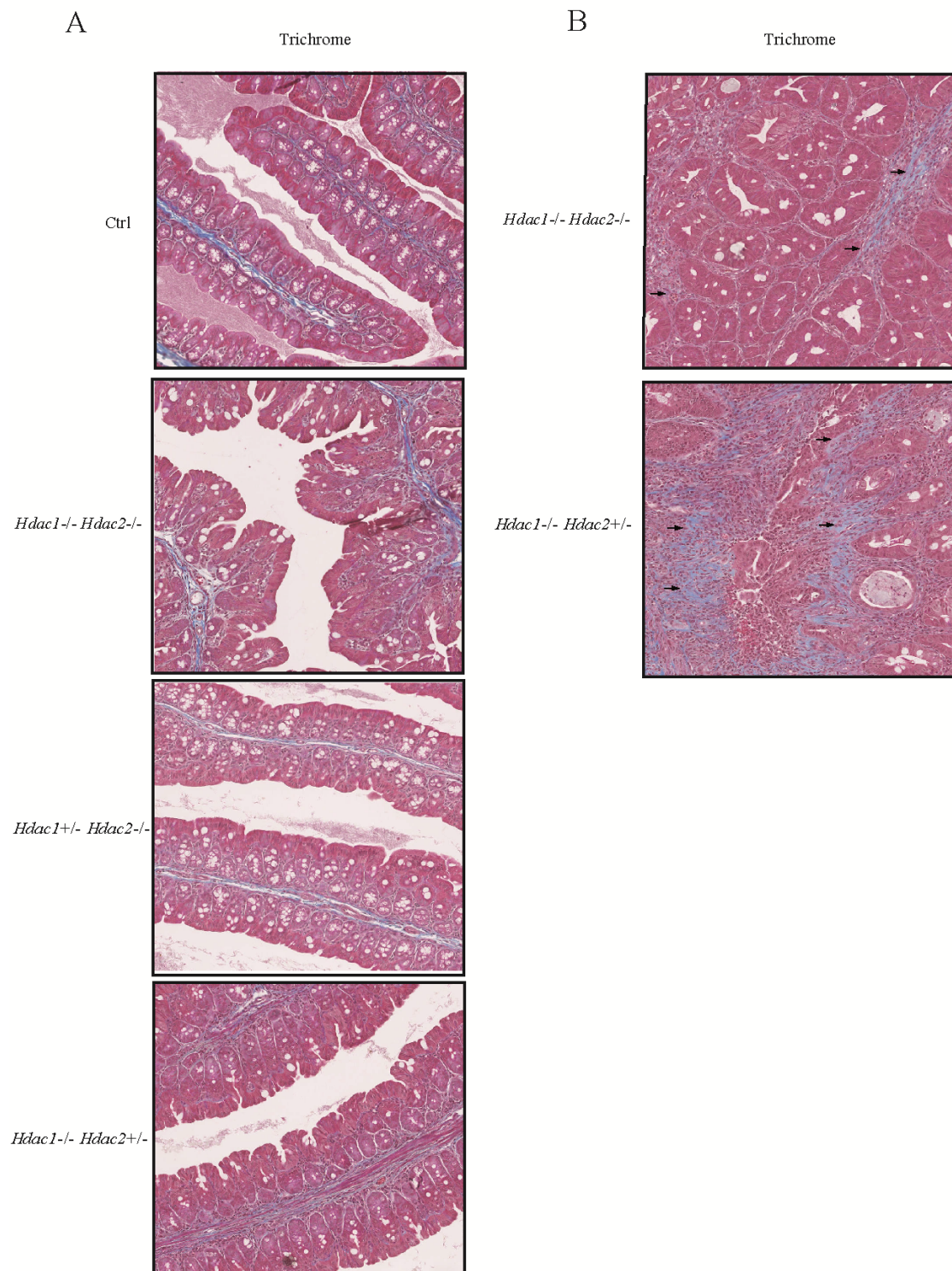
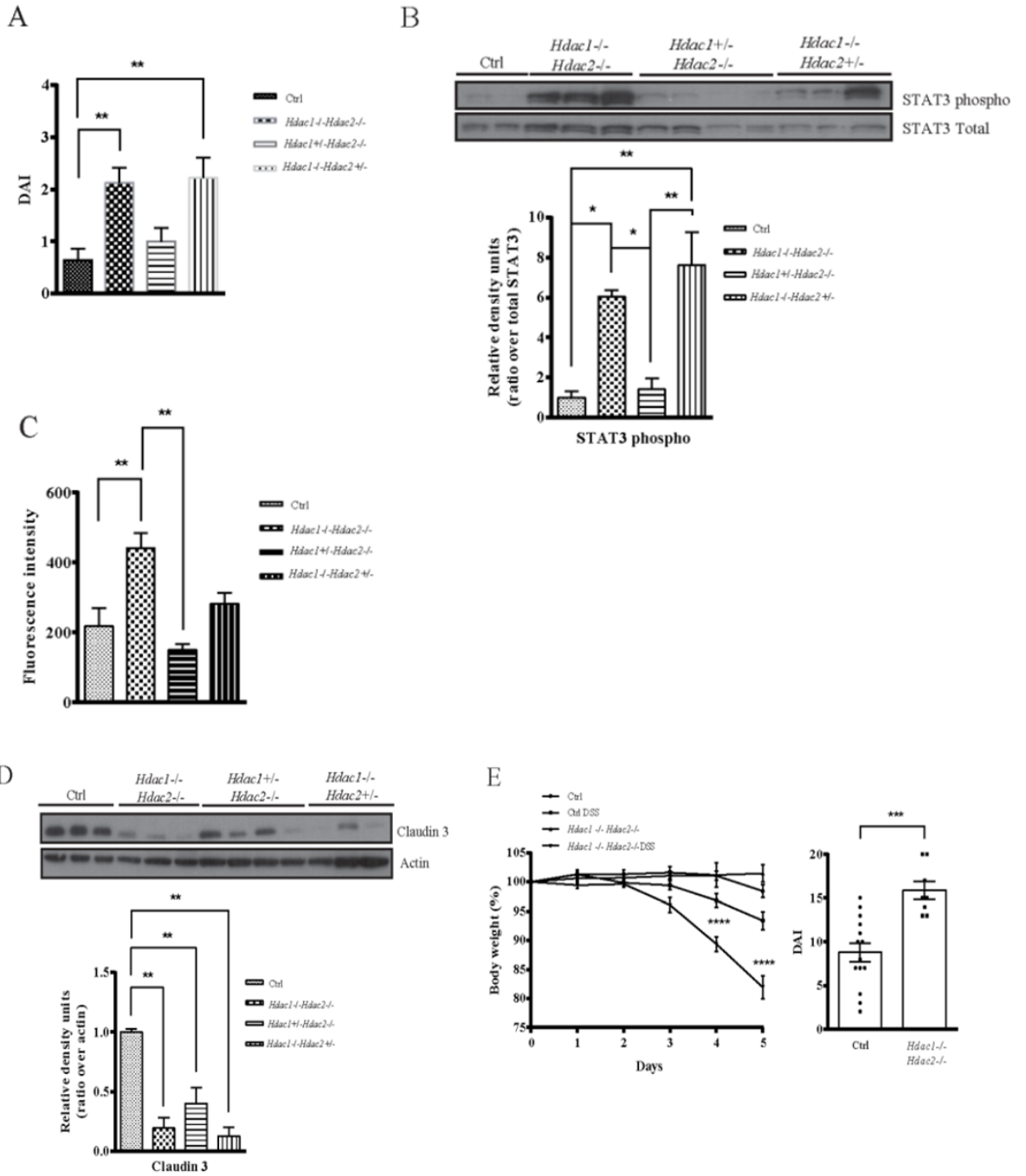


Figure 16 Supplementary Figure 6. Mice with one allele of IEC-specific *Hdac2* exhibit increased fibrosis. A, B. Colonic sections from three-month-old control (Ctrl), *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* mice were stained with Masson's trichrome. Representative images show different levels of collagen accumulation (A versus B for hardened tissue). Magnification: 20 X.

Based on these data, we determined the basal disease activity index (DAI) which assesses the level of inflammation, by measuring colon length, stool hardness and the presence of fecal blood. Mice with dual IEC-specific *Hdac1* and *Hdac2* deficiency, and mice with one allele of *Hdac2* displayed increased DAI (Fig. 6A). Western blot analysis showed increased phosphorylation and activation of the inflammatory transcription factor Stat3 in both mutants, as opposed to control mice and mice with one allele of *Hdac1* (Fig. 6B). To determine intestinal permeability, we gavaged mice with 4 kD FITC dextran and measured fluorescence intensity in the blood. Intestinal permeability was not significantly increased in *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* and *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* IEC-specific mutated mice, as opposed to the dual knockout (Fig. 6C), even though the expression of claudin 3, a component of tight junctions, was reduced in the three mutant backgrounds (Fig. 6D). This suggests that mutant mice could be more sensitive to colitis induction. Indeed, *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}*, *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* mutant mice were more sensitive than control mice to DSS-induced colitis, as determined by decreased body weight after treatment with DSS for 5 days, and increased DAI in comparison to control mice (Fig. 6E-G).



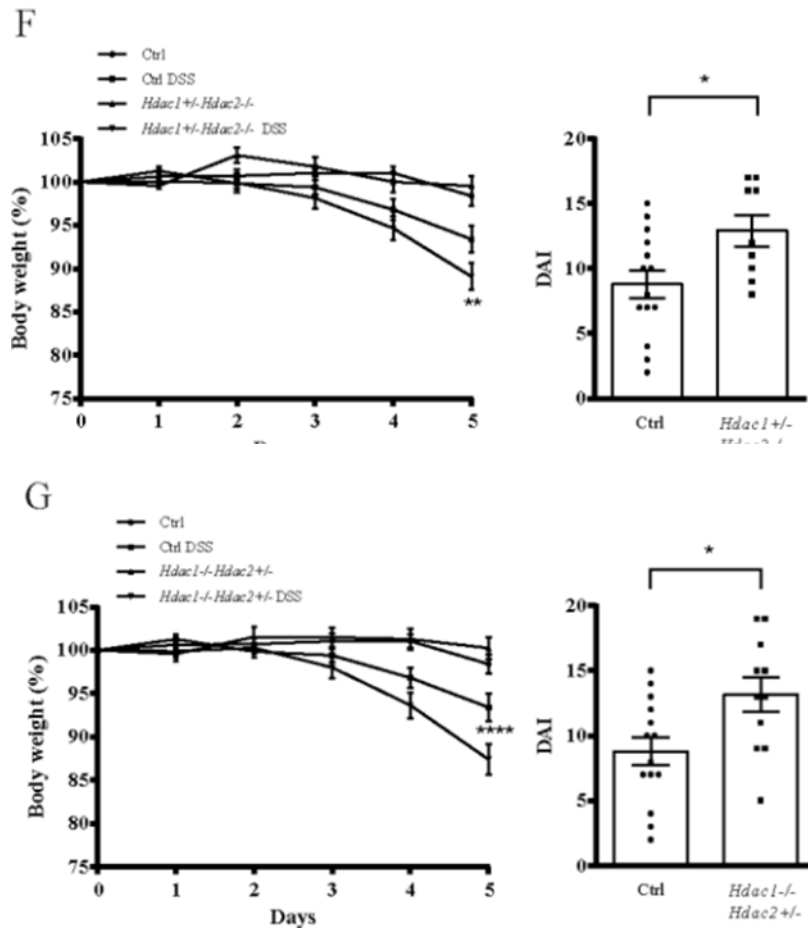


Figure 17 Figure 6. Different basal and DSS-induced responses are observed in single *Hdac1* and *Hdac2* IEC-specific mutant mice. A. The disease activity index (DAI), which includes weight, colon length, stool hardness and the presence of fecal blood, was measured in three-month-old control (Ctrl) (n= 17), *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* (n= 16), *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* (n= 10) and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* (n= 16) IEC-specific mutant mice. Results are expressed as the means \pm SEM (** $p \leq 0.01$). **B.** Total colonic protein extracts were separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes for Western blot analysis of total and phosphorylated Stat3 expression. The histogram represents the ratio of band intensities normalized to total Stat3. Quantification of band intensity was done with the Image J software. Results are expressed as the means \pm SEM (one-way Anova test, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$). **C.** Intestinal permeability was determined by measuring fluorescence intensity in blood recovered from three-month-old control (Ctrl) (n= 11), *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* (n= 8), *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* (n= 6) and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* (n= 8) IEC-specific mutant mice gavaged with 4 kD FITC dextran. Results are expressed as the means \pm SEM (** $p \leq 0.01$). **D.** Total colonic protein extracts separated on a SDS-PAGE gel were transferred to PVDF membranes for Western blot analysis of

claudin 3 and actin expression. The histogram represents the ratio of band intensities normalized to actin. Quantification of band intensity was done with the Image J software. Results are expressed as the means \pm SEM (one-way Anova test, ** $p \leq 0.01$). **E, F, G.** Mice were given DSS in water for five days. Body weight was measured each day, and DAI was measured on day 5. Body weight and DAI for *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* (**E**), *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* (**F**) and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* (**G**) mutant mice, in comparison to control mice, are indicated. Results are expressed as the means \pm SEM (Student's *t* test, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$; **** $p \leq 0.001$).

Our data indicate firstly that Hdac1 is a major regulator of intestinal homeostasis as one allele of *Hdac1* is sufficient to maintain overall intestinal cell proliferation, determination and barrier function. However, mice with one allele of *Hdac1* display some differences that result in increased sensitivity to DSS-induced colitis, suggesting that regulation of intestinal homeostasis depends on some thresholds of Hdac1 expression. Secondly, intestinal homeostasis is acutely sensitive to Hdac2 levels. Indeed, different levels of Hdac2, in an *Hdac1* deficient background, lead to different phenotypes, as observed in dual *Hdac1* and *Hdac2* knockout mice, in comparison to mice with only one allele of *Hdac2*. This indicates that different levels of Hdac1 or Hdac2-dependent deacetylase activities may result in differential effects on intestinal homeostasis. Thus, IEC-specific *Hdac1* and *Hdac2* show redundant and specific effects in the regulation of intestinal homeostasis. Different levels of IEC-specific HDAC activity and dosage lead to different homeostatic responses. Our results also suggest that compensatory mechanisms, initiated in the intestinal mucosa and environment after *Hdac1* and/or *Hdac2* depletion in *villin-Cre* mice, could explain some of the phenotypes observed. To answer this, we thus used adult murine short term deletion models, namely the *Ah-Cre* and the *villin-Cre^{ER}* models.

Ah-Cre-mediated deletion of Hdac1 and Hdac2 leads to decreased proliferation and increased DNA damage responses in mutant mice, as opposed to villin-Cre^{ER} mutant mice

Ah-Cre mice were crossed with *Hdac1* and *Hdac2* floxed mice to obtain dual *Hdac1* and *Hdac2* deletion after treatment of three-month-old mice with β -naphthoflavone for four days. Mice were killed three days after the last injection. Of five mice, one died before the end of the experiment and two were in critical condition.

Because of this extreme effect, we did not repeat the experiment. Deletion of both *Hdac1* and *Hdac2* in adult *Ah-Cre* mice disrupted intestinal architecture, with eroded intestinal epithelium, which was more evident in the moribund mice (data not shown). We thus analysed the jejunal epithelium of mice with an intermediary phenotype, to assess the effect of the deletion on the epithelium (n= 2). The short term deletion led to decreased numbers of jejunal crypts which were less defined, and of both goblet and Paneth cells (Fig.7A, B). BrdU labelling of crypts was reduced, suggesting cell proliferation impairment (Fig. 7C). We hypothesized that *Ah-Cre*-dependent deletion of both *Hdac1* and *Hdac2* could lead to proliferation inhibition by affecting DNA repair. Indeed, Hdac1 and Hdac2 are important regulators of DNA repair in response to DNA double-strand breaks (DSB) (Miller *et al.*, 2010). We thus verified the expression of γ -H2AX, a modified histone induced during DSB repair (Redon *et al.*, 2012). Interestingly, extensive γ -H2AX foci appeared in upper crypt and lower villus compartments of dual *Hdac1* and *Hdac2* deficient *Ah-Cre* knockout mice (Fig. 7D).

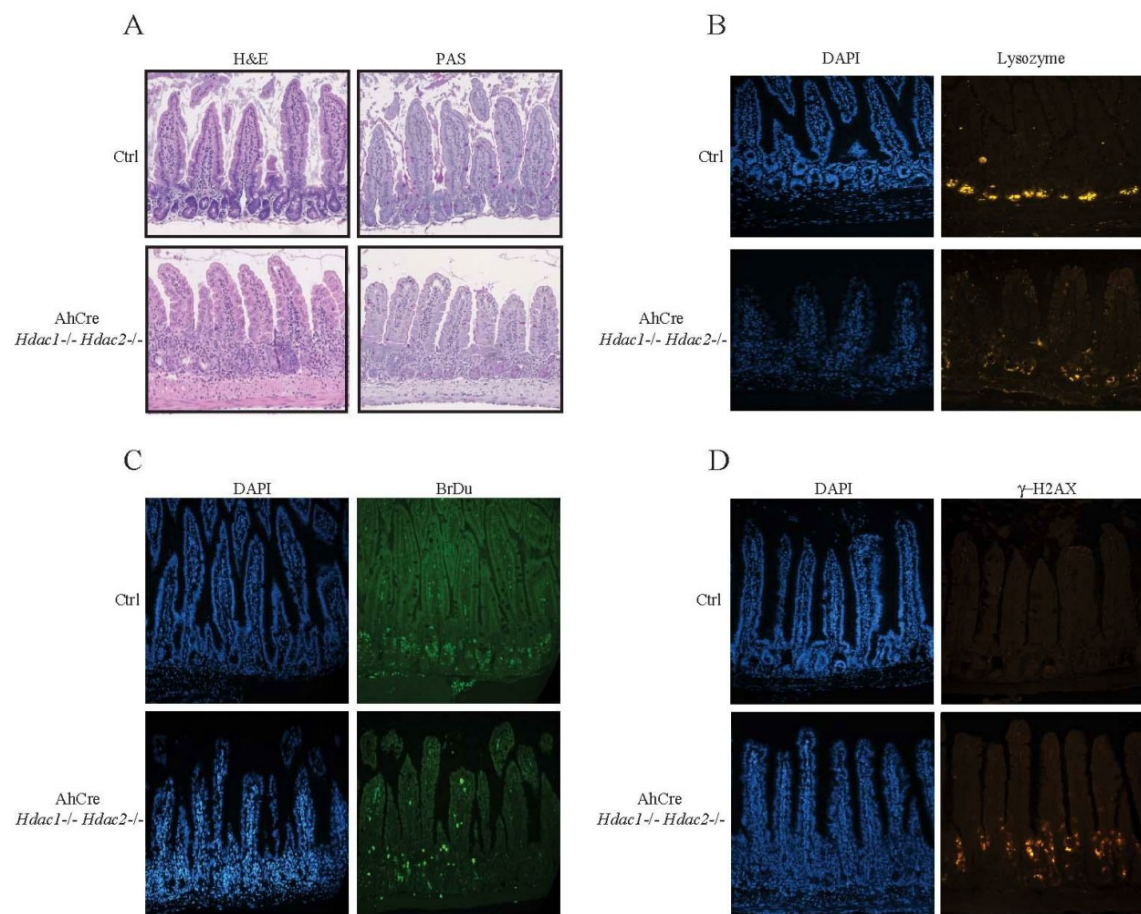


Figure 18 Figure 7. *Ah-Cre*-dependent *Hdac1* and *Hdac2* deletion in adult mice leads to intestinal epithelial erosion and a DNA damage response. *Ah-Cre* mice with *Hdac1* and *Hdac2* floxed alleles were injected intraperitoneally with β -naphthoflavone

for four days. Mice were killed three days after the last injection. Jejunal sections from control (Ctrl) and *Ah-Cre* conditional intestinal epithelial *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* mice were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff for goblet cell identification (A), with DAPI for nuclei labeling and with an antibody against lysozyme for Paneth cell identification (B). C. Jejunal sections from control (Ctrl) and *Ah-Cre* conditional intestinal epithelial *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* mice injected with BrdU were stained with DAPI and with an antibody against incorporated BrdU. D. Jejunal sections from control (Ctrl) and *Ah-Cre* conditional intestinal epithelial *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* mice were stained with DAPI and with an antibody against γ -H2AX (n=2). Magnification of representative tissue sections: 20 X.

The mutant mice also displayed major gastric defects, with reduced numbers of mucus-producing cells, as determined by Periodic Acid Schiff staining, expansion of the differentiated zone, as shown by increased numbers of proton pump/H⁺, K⁺-ATPase α subunit-expressing parietal cells, and decreased numbers of proliferating cells, as determined by BrdU labelling (Suppl. Fig. 7).

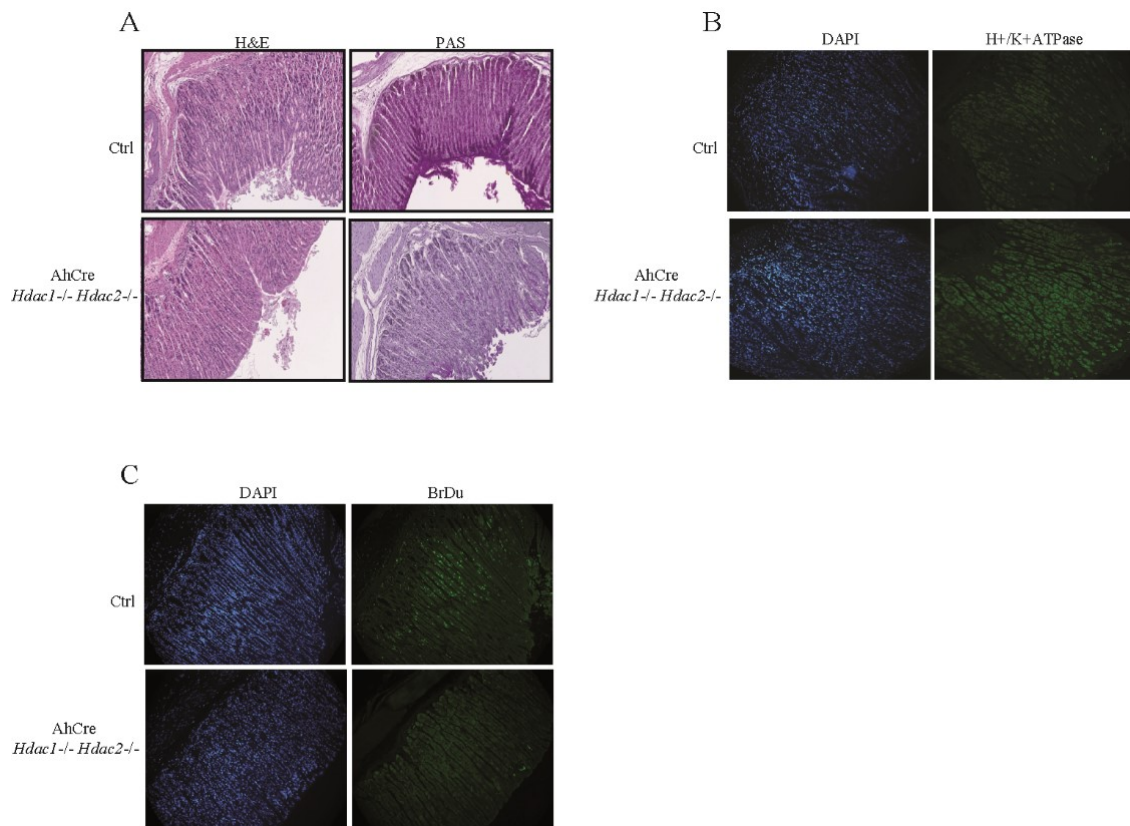


Figure 19 Supplementary Figure 7. *Ah-Cre*-dependent *Hdac1* and *Hdac2* deletion in adult mice leads to gastric defects. *Ah-Cre* mice with *Hdac1* and *Hdac2* floxed

alleles were injected intraperitoneally with β -naphthoflavone for four days. Mice were killed three days after the last injection. Gastric antrum sections from control (Ctrl) and *Ah*-Cre conditional intestinal epithelial *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} mice were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff for goblet cell identification (**A**), with DAPI for nuclei labelling and with an antibody against the proton pump/H⁺, K⁺-ATPase α subunit, for parietal cell identification (**B**). **C**. Gastric antrum sections from control (Ctrl) and *Ah*-Cre conditional intestinal epithelial *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} mice injected with BrdU were stained with DAPI or with an antibody against incorporated BrdU (n= 2). Magnification of representative tissue sections: 20 X.

We then used another type of specific gene deletion model, namely the *villin*-Cre^{ER} model. *Villin*-Cre^{ER} mice were crossed with *Hdac1* and *Hdac2* floxed mice to obtain dual *Hdac1* and *Hdac2* deletion after treatment with tamoxifen for five days. Mice were killed the day after the last injection. Deletion of both *Hdac1* and *Hdac2* disrupted intestinal architecture, with expanded crypts and villus length, as determined by hematoxylin and eosin staining, decreased numbers of goblet cells, as assessed by Periodic Acid Schiff staining (Fig.8A). In this model, Paneth cell numbers, as assessed by staining with an antibody against lysozyme, and IEC proliferation levels, as assessed by staining with an antibody against PCNA, were not affected (Fig. 8B). However, increased γ -H2AX foci formation was observed in the crypt compartment, but not to the same extent as in *Ah*-Cre mutant mice (Fig. 8C).

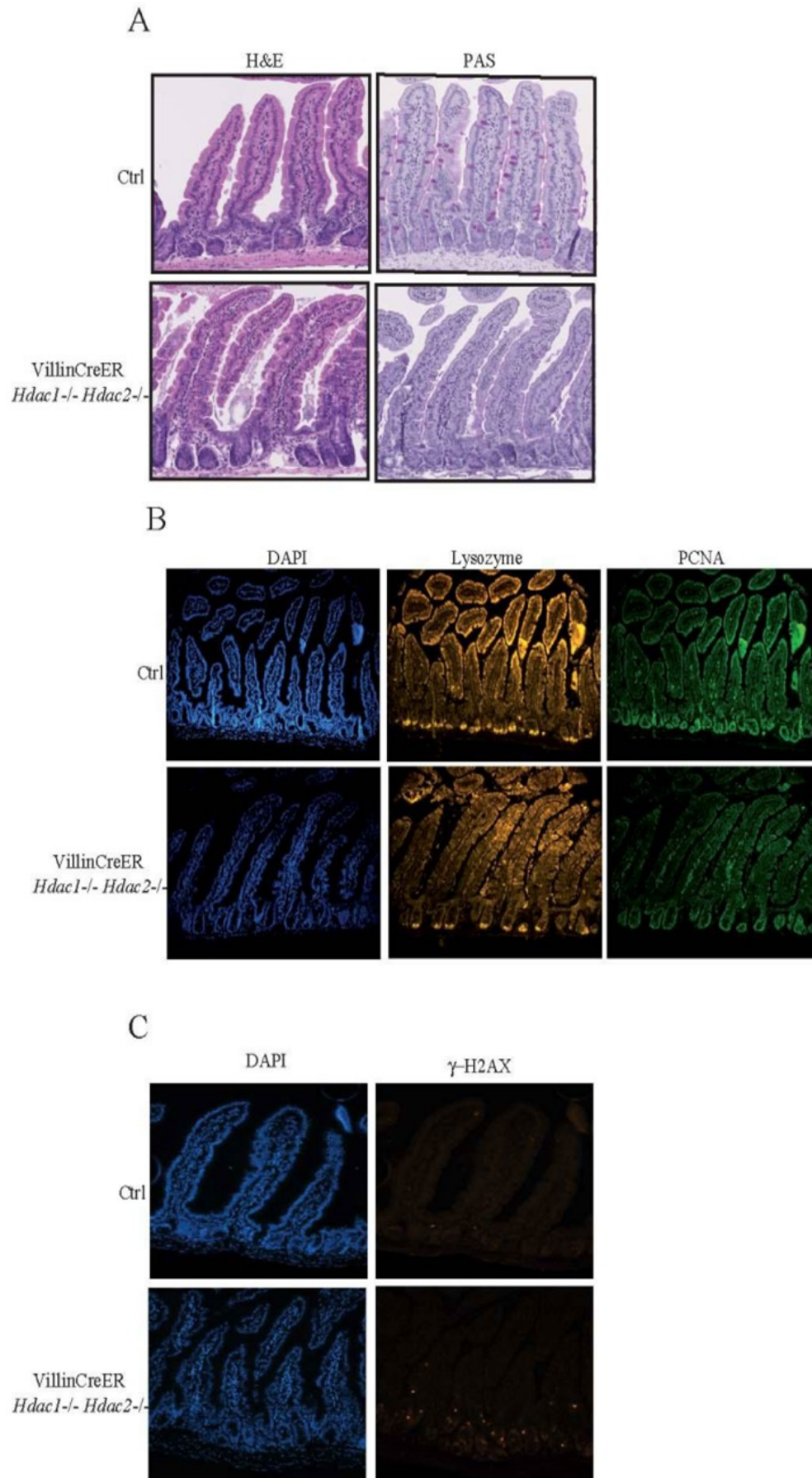


Figure 20 Figure 8. *Villin-Cre^{ER}*-dependent *Hdac1* and *Hdac2* deletion in adult mice leads to intestinal epithelial defects similar to dual *villin-Cre*-mediated knockout mice. *Villin-Cre^{ER}* mice with *Hdac1* and *Hdac2* floxed alleles were injected intraperitoneally with tamoxifene for five days. Mice were killed the day after. Jejunal sections from control (Ctrl) and *villin-Cre^{ER}* conditional intestinal epithelial *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* mice were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and PAS for goblet cell identification (**A**), with DAPI for nuclei labelling, with an antibody against lysozyme for Paneth cell identification and with an antibody against PCNA, to assess proliferation (**B**). **C.** Jejunal sections from control (Ctrl) and *villin-Cre^{ER}* conditional intestinal epithelial *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* mice were stained with DAPI or with an antibody against γ -H2AX (n= 2). Magnification of representative tissue sections: 20 X.

We then verified γ -H2AX expression in the jejunum of *villin-Cre* deletion models. In contrast to control mice and mice with one allele of *Hdac1*, dual *Hdac1* and *Hdac2* mutant mice showed increased γ -H2AX expression in the crypt and in the lower portion of the villus, and mice with one allele of *Hdac2* showed intermediary levels (Suppl. Fig. 8).

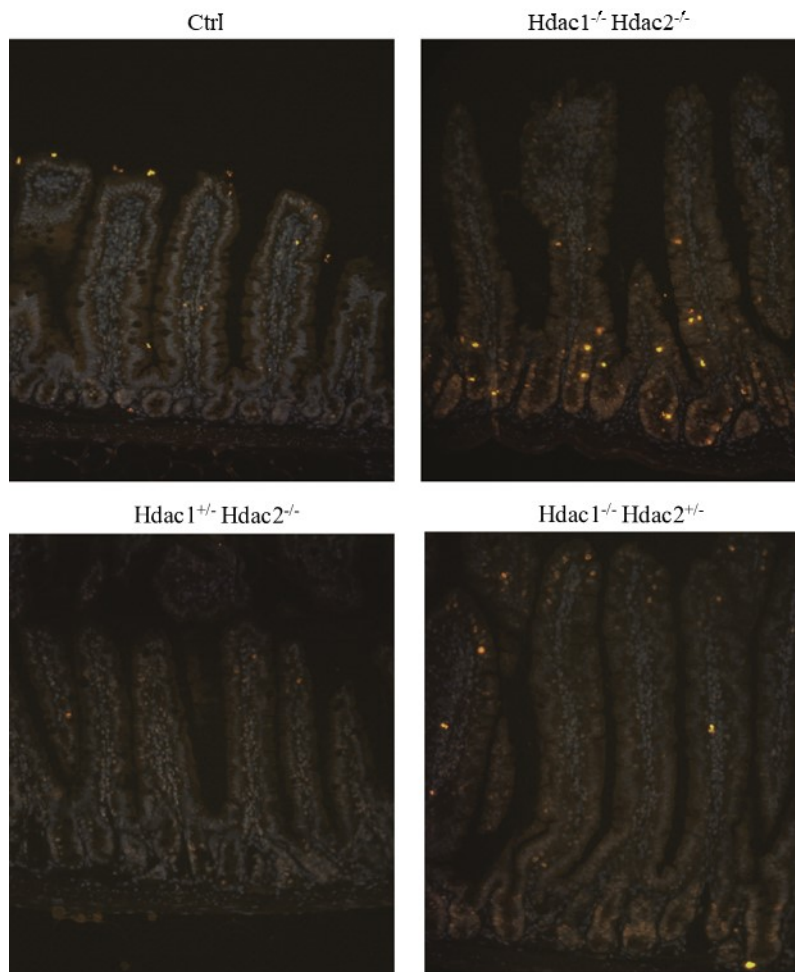


Figure 21 Supplementary Figure 8. γ -H2AX foci are increased in *villin-Cre Hdac1* and *Hdac2* IEC-specific mutant mice. Jejunal tissue sections from three-month-old conditional *villin-Cre* control, *Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}*, *Hdac1^{+/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* IEC-specific mutant mice were stained with DAPI and with an antibody against γ -H2AX, and images were merged (n= 3). Magnification of representative tissue sections: 20 X.

The *villin-Cre^{ER} Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* mouse phenotype observed thus resembled the phenotype of *villin-Cre Hdac1^{-/-}Hdac2^{-/-}* and *Hdac1^{-/-}Hdac2^{+/-}* mice, and was clearly different from the *Ah-Cre* deletion model.

Discussion

We have shown here that different levels of Hdac activities are associated with various phenotypic changes in the *villin-Cre* mouse model, and that *Hdac2* is an exquisite regulator of intestinal homeostasis. Indeed, mice with one allele of *Hdac2*

without *Hdac1* display intermediate phenotypes in comparison to dual knockout mice. Both IEC-specific *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} models share some phenotypic defects, notably increased proliferation, goblet cell number reduction, loss of polarity and tissue architecture, increased enterocyte marker expression in the colon, increased immune cell recruitment and colonic tissue fibrosis, and augmented sensitivity to DSS-induced colitis. However, migration and Paneth cell numbers were not significantly modified in mice with one allele of *Hdac2* as opposed to dual knockout mice. In addition, intermediate activation of the Notch, mTOR and Stat3 pathways was observed in the *Hdac2* heterozygous mouse in the absence of *Hdac1*. In contrast, the presence of one allele of *Hdac1* was sufficient to maintain proper intestinal homeostasis. Indeed, these mice did not display activation of the Notch, mTOR and Stat3 pathways. However, some differences were observed, namely expression of the small intestine enterocyte marker sucrase-isomaltase in the colon, decreased intermediary levels of claudin 3 and increased sensitivity to DSS-induced colitis. Thus, appropriate levels of *Hdac1* and *Hdac2* activities may be needed to insure correct intestinal homeostatic responses to injury.

Our data suggest that barrier function and mucosal immune homeostasis are highly dependent on the levels of *Hdac2* activity. Increased IEC proliferation in mice with one allele of *Hdac2* is associated with increased Notch activity, which leads to differentiation defects, such as decreased goblet cell numbers and with increased mTOR pathway and Stat3 activation. Recent data have shown a link between mTOR and Notch activation. Indeed, mTOR activation results in Notch activation in colon carcinoma cells (Zhou *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2015) and both Notch and Stat3 activation in other cell types (Ma *et al.*, 2010). Of note, both Stat3 (Neufert *et al.*, 2010) and Notch (Okamoto *et al.*, 2009, Sancho *et al.*, 2015) activation are important for IEC regeneration in injury and inflammatory-related conditions. Whether activation of these pathways is due to direct acetylation of protein targets, and their control by *Hdac1* and/or *Hdac2*, remains to be determined. Increased acetylation of Notch, resulting from SIRT1 deacetylase depletion, leads to decreased protein turnover of the Notch intracellular domain, leading to increased Notch-induced gene expression in endothelial cells (Guarani *et al.*, 2011). Notch3 acetylation leads to increased stability in T-cell leukemias (Palermo *et al.*, 2012). Ribosomal S6 kinase acetylation may modulate S6 kinase stability (Fenton *et al.*, 2010). While S6 kinase acetylation may reduce mTOR-dependent S6 kinase activation (Hong *et al.*, 2014), HDAC inhibitors, such as the

bacterial metabolite butyrate, may increase mTOR activity by increasing both S6 kinase phosphorylation and acetylation in T cells (Park *et al.*, 2015).

As *villin*-Cre deletion starts at E15.5, we used short-term deletion models to study the effect of *Hdac1* and *Hdac2* deletion in adult mice. β -Naphthoflavone-dependent induction of *Hdac1* and *Hdac2* deletion in *Ah*-Cre mice led to intestinal defects, notably eroded epithelium and erased crypts, reduced proliferation and decreased numbers of both Paneth and goblet cells. Epithelial gastric defects were also observed. This growth inhibitory phenotype was associated with increased γ -H2AX foci formation, indicating increased DNA damage responses and the presence of double-strand breaks (Redon *et al.*, 2012);(Ivashkevich *et al.*, 2012)DNA damage has also been observed *in vivo* in neural cells with dual *Hdac1* and *Hdac2* deletion (Hagelkruys *et al.*, 2014). Thus, *Ah*-Cre-dependent deletion of both *Hdac1* and *Hdac2* reveals their importance in the regulation of DNA replication and DNA repair (Miller *et al.*, 2010, Robert *et al.*, 2011, Bhaskara, 2015). Recently, Zimmerlin *et al.* (2015)(Zimmerlin *et al.*, 2015) have demonstrated a similar phenotype by deleting both *Hdac1* and *Hdac2* in the intestinal epithelium in the same *Ah*-Cre model. While the DNA damage response was not studied, they observed that *Hdac1* and *Hdac2* deletion led to IEC stemness impairment, both *in vivo* and in *Hdac1*- and *Hdac2*-depleted organoid cultures, as evidenced by decreased expression of stem cell markers. Thus, in addition to regulatory functions in IEC DNA repair, Hdac1 and Hdac2 may play essential roles in defining IEC stemness.

Short-term *Hdac1* and *Hdac2* IEC-specific deletion in *villin*-Cre^{ER} mice led to tissue architecture defects associated with expanded crypts and decreased numbers of goblet cells. Proliferation and Paneth cell numbers were not affected. As observed with the *villin*-Cre model, the knockout was not complete, and heterogeneous expression mostly of Hdac2 was still observed (Suppl. Fig. 9). Zimmerlin *et al.* (2015) showed that *Ah*-Cre mediated deletion of one allele of *Hdac2* and both *Hdac1* alleles led to differentiation defects closely resembling those obtained in our dual *Hdac1* and *Hdac2* *villin*-Cre^{ER} and *villin*-Cre models.

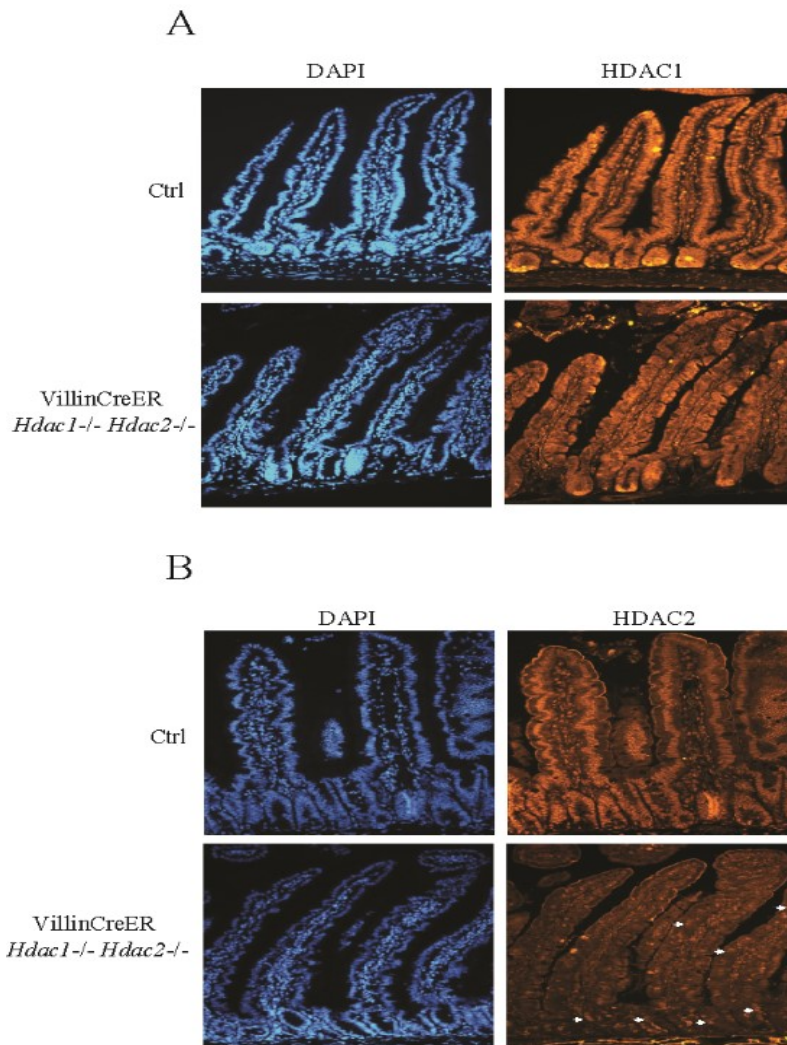


Figure 22 Supplementary Figure 9. Jejunal villin-Cre^{ER} *Hdac1* and *Hdac2* IEC-specific mutant still display patchy *Hdac2* expression. Jejunal tissue sections from three-month-old conditional villin-Cre^{ER} control or *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} IEC-specific mutant mice were stained with DAPI or with an antibody against Hdac1 (A) or Hdac2 (B). White arrows indicate the presence of Hdac2-stained cells in the mutant epithelium (B).

Thus, while *Ah*-Cre mediated deletion of *Hdac1* and *Hdac2* led to a growth arrest phenotype (our study, (Zimmerlin *et al.*, 2015)), villin-Cre^{ER} mediated deletion led to a phenotype that was similar to villin-Cre *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{-/-} and *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} deleted mice (our study), as well as *Ah*-Cre *Hdac1*^{-/-}*Hdac2*^{+/-} deleted mice (Zimmerlin *et al.*, 2015). Why is a growth arrest phenotype revealed only in the *Ah*-Cre mouse model? Why is there such a strong selection for non- or partially recombined cells in the villin-Cre models? One possibility would involve the interaction between IEC and the

mucosal inflammatory milieu. It has been proposed that inflammation impacts on intestinal stem cell proliferation and regeneration after damage (Kizil *et al.*, 2015). In *villin-Cre^{ER}* mice, the inflammatory milieu would favor the proliferation of partially recombined IEC, and would thus lead to expansion of mixed cell populations, as observed in the dual *villin-Cre* knockout mouse model. In *Ah-Cre Hdac1* and *Hdac2* mutant mice, the inflammatory milieu would not support the expansion of these cells. Indeed, the AhR transcription factor is activated by many ligands, including xenobiotics as well as a number of diet-derived ligands (Hao et Whitelaw, 2013, Fallarino *et al.*, 2014). AhR is considered a negative regulator of intestinal inflammation (Monteleone *et al.*, 2013). AhR activation is needed for intraepithelial lymphocyte and innate lymphoid cell maintenance and expansion. AhR activation by the TCDD ligand reduces DSS-induced colitis symptoms, in part by increasing anti-inflammatory Treg cell differentiation and inhibiting pro-inflammatory Th17 cells (Singh *et al.*, 2011). β -Naphthoflavone-dependent induction of AhR activity reduces DSS-induced colitis as well. In addition, AhR deletion in mice leads to increased DSS-induced colitis (Furumatsu *et al.*, 2011). By changing inflammatory signals, AhR activation could render the mucosal environment less supportive for expansion of a subset of partially recombined cells, as observed in *villin-Cre^{ER}* mice.

We have shown that intestinal homeostasis is exquisitely sensitive to gene-dosage variations in *Hdac1* and *Hdac2*, and that *Hdac1* and *Hdac2* display both specific and similar effects on IEC, leading to modifications of the mucosal environment and of the intestinal response to inflammatory stresses. Pharmacological HDAC inhibitors (HDACi) are being developed for treatment of cancer as well as inflammatory diseases (Cantley et Haynes, 2013, Falkenberg et Johnstone, 2014, Felice *et al.*, 2015). For example, non selective HDAC inhibitors vorinostat and givinostat reduce DSS-induced colitis symptoms in mice (Glauben *et al.*, 2006, Glauben *et al.*, 2008). Reduction of DSS-induced colitis by the HDAC inhibitor trichostatin A in mice correlates with increased Treg cell differentiation (Tao *et al.*, 2007). It is clear that HDACi will impact many cell types, including IEC and mucosal immune cells. As more specific HDAC inhibitors are being developed, it will be important to determine the roles of specific histone deacetylases in IEC. It will also be important to assess the effect of these compounds separately on IEC and gut immune cells, but also the global effect of this two-way interaction on the intestinal mucosa.

In conclusion, intestinal homeostasis is exquisitely sensitive to Hdac2 levels, as shown by the effect of Hdac1 and Hdac2 gene-dosage-dependent variations on different phenotypes, from IEC fate impairment to DNA damage responses. As readers of environmental changes, Hdac1 and Hdac2 may play an important role in the transmission of these alterations to the mucosal and immune intestinal environment.

Acknowledgements

Claude Asselin, François Boudreau, Nathalie Perreault and Nathalie Rivard are members of the Fonds de recherche du Québec-Santé-funded CR-CHUS. We thank Dr EN Olson for providing *Hdac1* and *Hdac2* conditional knock-out mice, Dr AR Clarke for *Ah-Cre* inducible mice and Dr S Robine for *villin-Cre^{ER}* inducible mice. We thank the Electron Microscopy & Histology Research Core of the FMSS at the Université de Sherbrooke for histology, electron microscopy and phenotyping services. This work was supported by a grant from Crohn and Colitis Canada.

3. CHAPITRE 2 : HDAC1 et HDAC2 affectent le développement de l'épithélium intestinal en perturbant les voies de synthèse protéique, métabolique et de défense

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1 Marquage des protéines au TMT et spectrométrie de masse

Les CEI de jéjunum de trois souris contrôle et trois souris HDAC1/2^{-/-} Villine-Cre ont été isolées par la procédure d'extraction à l'EDTA (Turgeon *et al.*, 2013). Les CEI sont lysées dans du tampon Triethylammonium bicarbonate (TEAB) (100 mM, 10% SDS) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). 50 µg de protéines ont été dosés avec la technique de dosage par l'acide bicinchonique (BCA) (Thermo Fisher Scientific) (Gonneaud *et al.*, 2015) pour chacun des 6 échantillons. Les protéines sont réduites par le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (Thermo Fisher Scientific) pendant 1 h à 55°C, et alkylées avec de l'iodoacétamide 375 mM (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 min à l'obscurité. Les protéines sont ensuite précipitées à l'acétone à -20°C pendant 4 h. Les culots de protéines sont resuspendus dans le tampon TEAB et la trypsine (1,25 µg pour 50µg de protéines) est ajoutée pour une digestion sur la nuit ou de 16 h à 37°C. Après la digestion, les peptides sont étiquetés avec des molécules de différentes masses isobariques chimiques (Tandem Mass Tag Reagents (TMT), Thermo Fisher Scientific) de 126 à 131 Da et de 126 à 128 Da pour marquer les trois contrôles et 129-131 Da pour marquer les trois mutants. Après une heure d'incubation à température ambiante, la réaction est arrêtée par l'ajout d'hydroxylamine 5% en agitant pendant 15 min. Les échantillons de peptides étiquetés sont mélangés avant d'être nettoyés sur des colonnes C18, selon le protocole fourni par le fabricant (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons sont ensuite séparés par chromatographie en phase liquide et par spectrométrie de masse MS/MS (Jostins *et al.*, 2012). L'identification des protéines et la quantification des peptides étiquetés TMT sont réalisées en utilisant le logiciel MaxQuant version 1.5.2.8 (Cox et Mann, 2008) et une base de données de protéines de souris Uniprot contenant 89 422 protéines (Gonneaud *et al.*, 2016). Quelques modifications liées à l'identification et à la quantification des protéines ont été apportées grâce aux paramètres suggérés par Thermo Fisher pour la quantification et la détection des échantillons TMT sur les spectromètres de masse Q Exactive.

(Paramètres MS: Resolving power (FWHM at m/z 200): 70,000; AGC target: 3e6; Max.injection time (ms): 50; Scan range (m/z): 375–1400. Paramètres MS/MS: Resolving power (FWHM at m/z 200): 35,000; AGC target: 1e5; Maximum injection time (ms): 100; Isolation width (Th) 0.7 or 1;2 Normalized collision energy (NCE) 32) (<https://tools.ThermoFisher.com/content/sfs/posters/PN-64412-MS-Isobaric-Mass-Tagging-Quantification-ASMS2015-PN64412-EN.pdf>). Dans ce cas, le *False discovery rate* (FDR) a été ajusté à 5%. L'ensemble des protéines présentant des variations supérieures et inférieures à 50% a été conservée pour la suite des analyses bio-informatiques.

3.1.2 Séquençage des ADNc

Les ARN totaux des CEI isolées des jéjunum de trois souris contrôle et de trois souris mutantes *Hdac1/2*^{-/-} Villine-Cre de trois mois ont été isolés avec la trousse ToTALLY RNA™ (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) et Rneasy (Qiagen, Montreal, QC, Canada). Les ARN totaux ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific). L'intégrité des ARN a été évaluée sur un 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). Seuls les échantillons avec un *RNA Integrity Number* (RIN) > 6,5 passent le seuil de qualité. La génération de la librairie d'ADNc et l'analyse du transcriptome avec l'appareil Illumina HiSeq4000 (Illumina, San Diego, Ca, USA) ont été réalisées à la plateforme GénomeQuébec de l'université McGill. Brièvement, les librairies ont été générées à partir de 250 ng d'ARN total. L'enrichissement en ARNm a été effectué en utilisant le module d'isolement magnétique NEBNext Poly(A) (New England BioLabs, Whitby, ON, Canada). La synthèse de l'ADNc a été obtenue avec les trousse NEBNext RNA First Strand Synthesis et NEBNext Ultra Directional RNA Second Strand Synthesis Modules (New England BioLabs). Les étapes restantes de la préparation de la librairie ont été effectuées en utilisant et la trousse de préparation de la librairie d'ADNc NEBNext Ultra II pour appareil Illumina (New England BioLabs). Les adaptateurs et les amorces PCR ont été achetés chez New England BioLabs. Les librairies ont été quantifiées à l'aide de la trousse d'analyse dsDNA Quantus iT™ PicoGreen® (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) et celle de la Kapa Illumina GA (Fast Universal Primers-SYBR ; Kapa

Biosystems, Wilmington, MA, USA). Les fragments de taille moyenne ont été déterminés à l'aide d'un instrument LabChip GX (PerkinElmer, Hopkinton, MA, USA). Pour le séquençage avec le séquenceur Illumina HiSeq4000 PE100, le positionnement est effectué avec le logiciel Star 2.4.0f1. Ensuite, les transcrits sont triés selon le DEseq ajusté à 0,05. En fonction des variations, seuls les transcrits augmentés ou diminués de plus de 2 fois entre les mutants et les contrôles sont conservés pour les analyses bio-informatiques subséquentes.

3.1.3 Analyse bio-informatique

Une fois triées, les données comparatives de protéomique (TMT) et de transcriptomique (ARN-Seq) pour les souris *Hdac1/2*^{-/-} Villine-Cre et contrôle sont analysées avec le logiciel DAVID 2.0 pour l'ontologie des gènes (Dennis *et al.*, 2003) pour identifier les processus biologiques affectés suite à la perte de HDAC1 et HDAC2 avec une p-value < 0,05 et avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Qiagen Inc., <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuitypathway-analysis>). Ce dernier permet d'identifier les principales voies biologiques modifiées, les liens et les variations entre les différents échantillons et également de prédire l'activation de certaines voies (URA – z-score) par recoupage et intégration/interrogation avec les bases de données IPA (Kramer *et al.*, 2014).

3.2 Résultats

Nous avons montré que la double délétion de *Hdac1* et de *Hdac2* dans les CEI entraîne des défauts dans la détermination des CEI et dans la fonction barrière, avec une inflammation chronique au niveau de la muqueuse, et une sensibilité accrue à la colite induite par le DSS, accompagné de l'activation de diverses voies de signalisation, telles que les voies Notch, mTOR et STAT3. Nos résultats suggèrent donc que HDAC1 et HDAC2 régularisent les fonctions des CEI. Nous avons aussi montré que différents niveaux de HDAC1 et HDAC2 entraînaient des phénotypes différents au niveau de l'intestin, et que HDAC1 et HDAC2 jouaient des rôles similaires, complémentaires et différents. Il apparaît important de déterminer les cibles spécifiques de HDAC1 et HDAC2 étant donné l'utilisation possible de HDACi dans la résolution de l'inflammation intestinale

et le développement de HDACi de plus en plus sélectifs. Afin de déterminer le rôle exact de HDAC1 et de HDAC2 et leurs cibles, nous avons développé une double approche protéomique et transcriptomique pour évaluer les changements moléculaires dans les CEI suite à la perte de *Hdac1* et *Hdac2*.

Nous avons isolé les CEI de jéjunum de souris contrôle et de souris sans *Hdac1* et *Hdac2*. Les ARNs ont été isolés afin de déterminer le transcriptome par ARN-seq. Plus de 19500 transcrits ont été identifiés, dont 1904 transcrits augmentés de plus de 2 fois et 1682 transcrits diminués de plus de 2 fois dans les CEI mutantes. Les protéines ont été digérées et les peptides marqués au TMT ont été analysés au niveau du protéome par spectrométrie de masse. Avec cette approche, nous avons identifié plus de 3000 protéines, dont 324 étaient augmentées de plus de 50%, et 430 diminuées de plus de 50% dans les CEI mutantes (Figure 23).

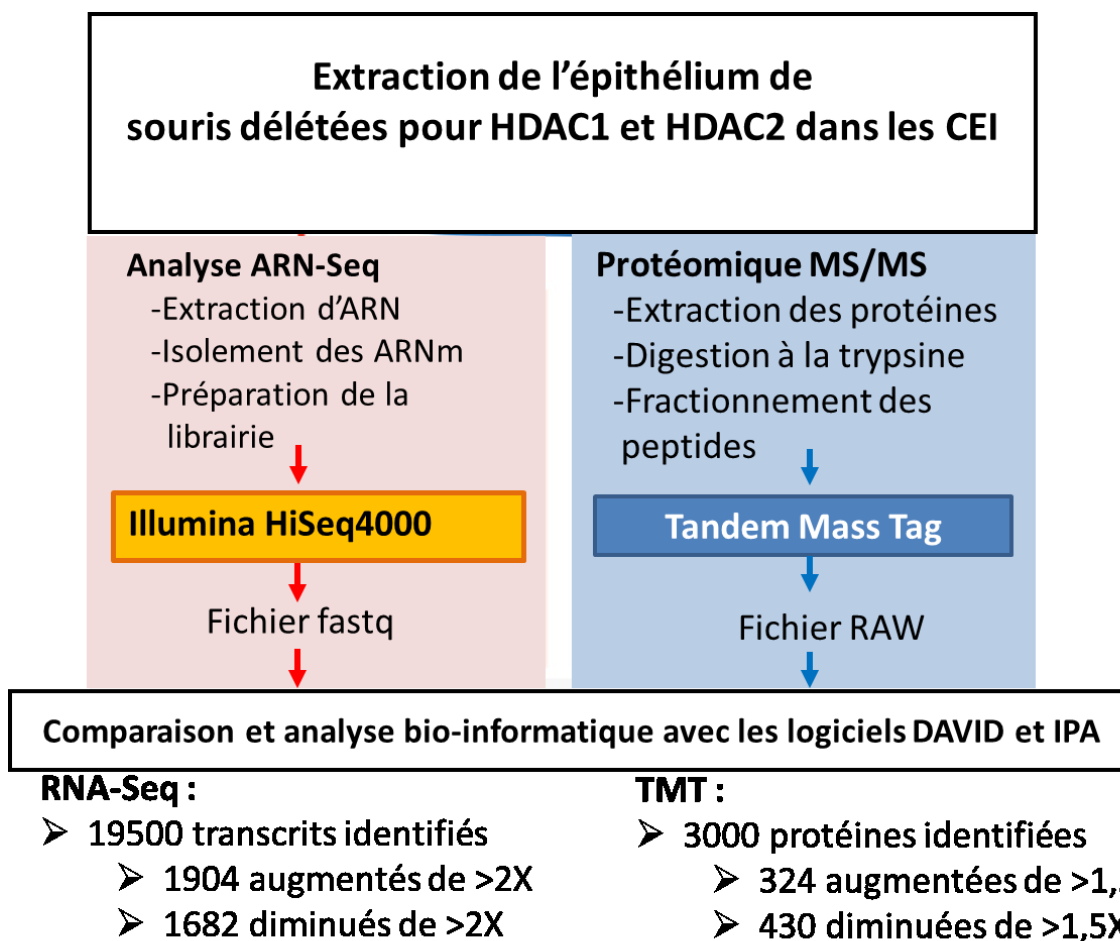


Figure 23 Analyse transcriptomique et protéomique réalisée sur des CEI *Hdac1/2*^{-/-} isolées de jéjunum murin. (Adapté (Sheynkman *et al.*, 2014))

Les résultats démontrent d'abord que la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI affecte autant à la hausse qu'à la baisse, l'expression d'ARN et de protéines, bien que la couverture des transcrits soit largement supérieure à la détection des protéines (Figure 23). Donc, HDAC1 et HDAC2 influencent autant l'induction que la répression des gènes et leur traduction en protéines.

Par la suite, nous avons comparé les données triées augmentées et diminuées entre elles avec le logiciel IPA, afin de déterminer les voies affectées intrinsèquement dans les CEI. Le diagramme de Venn révèle que peu de protéines et de transcrits, soit 284, sont partagés, avec 3073 transcrits et 432 protéines non-partagés. Ceci est dû en partie, à la

couverture protéique moindre (Figure 24 A). Ces informations suggèrent la possibilité d'un certain niveau de régulation post-transcriptionnelle, assurant une stabilisation de certaines protéines ou une augmentation de la traduction, en l'absence de *Hdac1* et *Hdac2*.

L'analyse combinée des voies canoniques révèle des voies de signalisation partagées entre le RNA-Seq et le TMT (Figure 24 B). Par exemple, même si la voie EIF2 impliquée dans la traduction semble à la baisse au niveau des transcrits, les protéines sont augmentées. Les transcrits associés aux voies p70S6K et mTOR sont augmentés, ce qui suggère une augmentation globale de la voie mTOR, qui régularise la synthèse des protéines. Ceci corrèle avec notre observation d'une augmentation de l'activité de la voie mTORC1, décelée par des niveaux plus élevés de phosphorylation d'un marqueur en aval de la voie, la protéine ribosomale S6 (Turgeon *et al.*, 2013).

D'autres voies altérées comprennent les voies régularisées par des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Bien que la voie LXR/RXR soit augmentée au niveau des transcrits, celle-ci est diminuée au niveau protéique, de même qu'une autre voie régularisée par les récepteurs PPAR α /RXR α (Figure 24 B). À ces deux voies s'ajoutent la voie NRF2 qui est aussi diminuée. L'ensemble de ces voies sont reliées entre elles. En effet, LXR et le récepteur activé par le proliférateur de peroxydome (PPAR) sont deux membres des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol (Li et Glass, 2004). NRF2, un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydatif, peut influencer positivement ou négativement PPAR (Ma, 2013). De plus, NRF2 présente des fonctions dans le métabolisme, notamment en bloquant l'activité d'ACL, l'enzyme produisant de l'acétyl-CoA (Kitteringham *et al.*, 2010) (Figure 24 B).

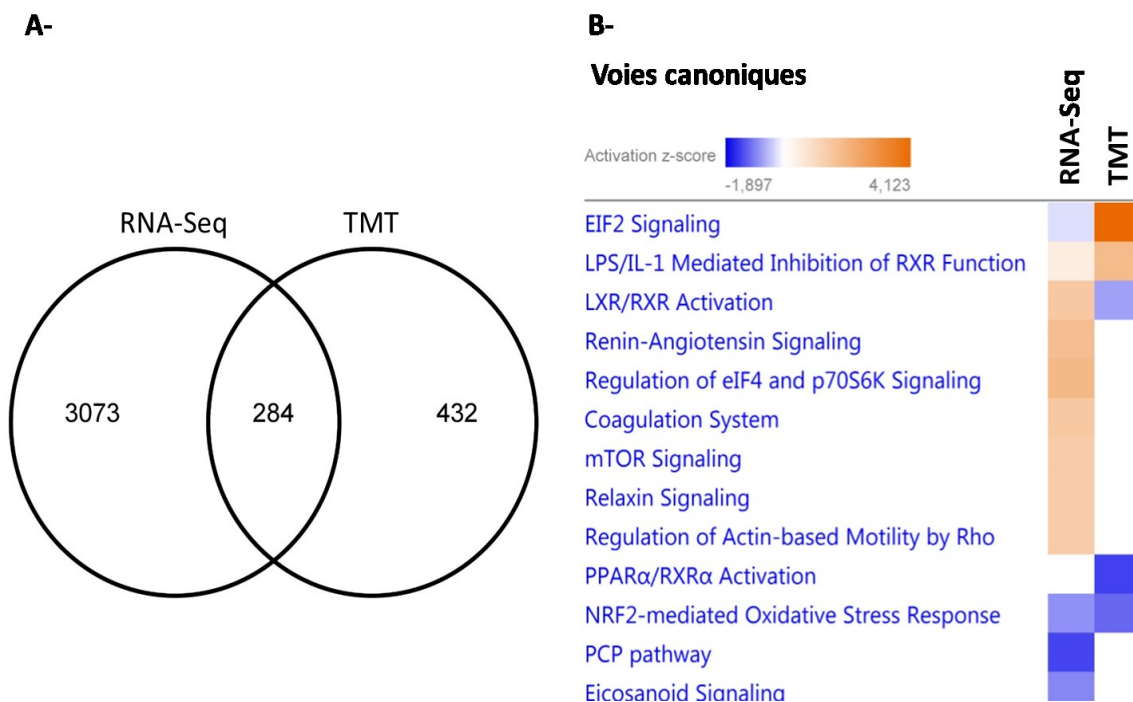


Figure 24 La perte de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI entraîne des modifications similaires et différentes au niveau de la régulation des gènes et des protéines. A. Diagramme de Venn comparant les transcrits triés (plus ou moins deux fois, RNA-Seq) et les protéines triées (plus ou moins 50%, TMT). **B.** Analyse et comparaison des voies canoniques entre le transcriptome (ARN-Seq) et le protéome (TMT) avec le logiciel IPA.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'ontologie avec le logiciel DAVID 2.0, toujours selon les transcrits et les protéines augmentés ou diminués. Concernant les transcrits, les processus biologiques augmentés comprennent les voies impliquées dans le développement, la réponse au stress et la traduction, incluant la biogénèse des ribosomes. Les processus biologiques diminués concernent le métabolisme, le développement, incluant la désacétylation des protéines, et la réponse immunitaire, particulièrement au niveau de la présentation des antigènes. Les voies métaboliques touchant les lipides sont affectées autant à la hausse qu'à la baisse, alors que les processus d'oxydo-réduction sont diminués (Tableau 2-A).

Au niveau des protéines, les processus biologiques augmentés comprennent la traduction, notamment la maturation des protéines, et le métabolisme, principalement au

niveau de la glycolyse. En accord avec la perte de *Hdac1* et *Hdac2*, les processus diminués comprennent la chromatine, dont le « silencing » de la chromatine associé à une diminution au niveau de l'assemblage des chromosomes, le métabolisme, principalement au niveau des lipides, et la défense, notamment au niveau de la réponse aux bactéries. (Tableau 2-B).

A-

| Processus biologiques | | | |
|--|----------|---|----------|
| Transcrits augmentés >2X | | Transcrits diminués >X2 | |
| Term | P-Value | Term | P-Value |
| Développement | | Métabolisme | |
| -cell differentiation | 3,90E-04 | -oxidation-reduction process | 3,20E-07 |
| -multicellular organism development | 4,20E-05 | -metabolic process | 1,80E-05 |
| Métabolisme | | -lipid metabolic process | 8,30E-04 |
| -metabolic process | 9,90E-04 | Développement | |
| -lipid metabolic process | 2,40E-05 | -protein deacetylation | 8,00E-04 |
| Stress | | -epithelial cell differentiation | 5,60E-04 |
| -response to hypoxia | 3,70E-04 | -transport | 8,30E-04 |
| -negative regulation of extrinsic apoptotic pathway via death domain receptors | 1,20E-05 | Réponse immunitaire | |
| Traduction | | -antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I | 5,80E-04 |
| -rRNA processing | 1,80E-04 | | |
| -ribosome biogenesis | 1,90E-03 | | |

B-

| Processus biologiques | | | |
|-----------------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| Protéines augmentées >50% | | Protéines diminuées >50% | |
| Term | P-Value | Term | P-Value |
| Traduction | | Chromatine | |
| -translation | 1,30E-31 | -nucleosome assembly | 1,60E-18 |
| -cytoplasmic translation | 4,50E-14 | -chromatin silencing | 4,20E-10 |
| -ribosomal small subunit assembly | 1,70E-09 | Métabolisme | |
| -translational elongation | 1,50E-04 | -metabolic process | 3,70E-09 |
| -rRNA processing | 4,60E-04 | -fatty acid beta-oxidation | 3,50E-08 |
| -protein folding | 5,10E-04 | -lipid metabolic process | 2,00E-07 |
| Métabolisme | | Défense | |
| -glycolytic process | 4,20E-05 | -defense response | 5,50E-14 |
| -metabolic process | 1,80E-04 | -defense response to bacterium | 3,10E-09 |
| -glutathione metabolic process | 1,90E-04 | | |

Tableau 2 La perte de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI affecte les processus métaboliques, la différenciation, les mécanismes de défense et de régulation épigénétique. A- L'ontologie des gènes dans les processus biologiques pour les transcrits

diminués et induits (< 2 et > 2) (valeur $p \leq 0,05$). B- L'ontologie des gènes dans les processus biologiques pour les protéines diminuées et induites ($< 50\%$ et $> 50\%$) (valeur $p \leq 0,05$).

Il est important de souligner que cette analyse prédit une réduction des processus inflammatoires au niveau des CEI, alors que l'analyse transcriptomique par micropuces, à partir des ARNs obtenus de la muqueuse intestinale complète, suggérait une activation de l'inflammation et du recrutement de cellules immunitaires (Turgeon *et al.*, 2014). Cette analyse laisse donc supposer l'induction de certaines voies de signalisation affectant la production de ribosome et d'ARNr couplée à une augmentation de la traduction, spécifiquement au niveau des CEI. Cela pourrait être en accord avec une augmentation de la prolifération et une activation de la voie mTORC1 dans les souris mutantes (Turgeon *et al.*, 2013, Turgeon *et al.*, 2014). Des défauts au niveau de la chromatine et des modifications de l'acétylome résultant d'une désacétylation diminuée corrélerent avec les délétions de deux « erasers » *Hdac1* et *Hdac2*. Des variations notables sont néanmoins suggérées pour le métabolisme, notamment au niveau des lipides et de la glycolyse, voies qui participent à la fois à la production d'énergie pour la cellule mais également à la production d'acétyl-CoA, principal donneur de groupement acétyl (Galdieri *et al.*, 2014). La perte de HDAC1 et HDAC2 pourrait entraîner une perturbation directe ou indirecte de ces voies, car la demande en groupement acétyl pourrait être accrue, étant donné que le pool de groupements acétyl associés aux protéines est moins disponible et que l'augmentation de la traduction mène à une consommation plus élevée d'énergie. Nos observations suggèrent donc un rôle de HDAC1 et HDAC2 dans le contrôle de voies inflammatoires et métaboliques.

Nous avons poursuivi les analyses comparatives avec le logiciel IPA en utilisant leur système de calcul via le Z-score, afin d'identifier les fonctions biologiques et pathologies reliées, de même que le système de prédictions d'activation de certains régulateurs avec le Upstream Regulator Analysis (URA). L'URA identifie les molécules en amont des gènes dans l'ensemble de données afin d'expliquer potentiellement les changements d'expression observés. Le Z-score prédit l'activation, si le Z-score est

supérieur à 2, ou l'inhibition, si le Z-score est inférieur à -2, des régulateurs en fonction des relations avec les gènes et des ensembles de données et la direction du changement d'expression des gènes. Z-score et P-value permettent donc d'identifier les régulateurs d'intérêt. Dans le descriptif lié aux petites molécules (médicaments et composés) ou aux microARN prédits comme régulateurs en amont, les termes «activé» ou «inhibé» peuvent apparaître un peu confus. Dans ces cas, activé peut être considéré comme signifiant que le modèle d'expression dans l'ensemble de données est cohérent avec la molécule en amont ayant plus d'activité ("activé") ou moins d'activité ("inhibée") dans l'expérience par rapport au contrôle (Kramer *et al.*, 2014).

Des fonctions similaires sont suggérées suite à l'analyse du transcriptome et du protéome. En effet, les fonctions associées à la prolifération, l'invasion, la migration et la taille des organes sont prédites augmentées au niveau des transcrits alors que des fonctions associées au cancer intestinal et à la néoplasie, donc à la prolifération entre autres, sont augmentées au niveau des protéines. Deux fonctions biologiques associées à l'inflammation sont augmentées au niveau du protéome. Dans ce cas, il est intéressant de souligner que ces catégories sont reliées à une inflammation d'une région du corps, donc de l'environnement : ceci laisse suggérer un effet de la perte de HDAC1 et HDAC2 sur les CEI, qui peut entraîner un changement dans l'environnement. Une autre fonction augmentée au niveau du protéome concerne la mort des organes, et corrèle avec l'augmentation de la caspase 3 clivée, une caspase effectrice de l'apoptose, observées dans des extraits protéiques de muqueuse provenant des souris mutantes (Turgeon *et al.*, 2013).

Étonnamment, les fonctions associées à la mort cellulaire sont aussi diminuées au niveau des transcrits et des protéines. Il est possible que les CEI sans *Hdac1* et *Hdac2* compensent pour un accroissement de la mort cellulaire, par une augmentation de signaux de survie et de prolifération. Le résultat final étant une augmentation de la taille de l'intestin dans les doubles mutants (Turgeon *et al.*, 2013). La plupart des autres fonctions prédites diminuées au niveau des transcrits et des protéines regroupe des fonctions métaboliques liées aux lipides, comme la conversion, le transport ou encore l'oxydation.

Ces analyses corréleront avec les précédents résultats obtenus par les études dans DAVID 2.0 concernant les processus métaboliques glucidiques et lipidiques (Tableau 3).

| Top increased Disease and Bio functions (z-score) | | | |
|--|--------------|---|--------------|
| RNA-Seq | | TMT | |
| microtubule dynamics | 3,48 | inflammation of body cavity | 3,11 |
| formation of cellular protrusions | 3,40 | Gastrointestinal Tract Cancer and Tumors | 2,77 |
| organization of cytoskeleton | 3,39 | intestinal cancer | 2,43 |
| proliferation of cells | 3,34 | gastrointestinal tract cancer | 2,43 |
| organization of cytoplasm | 3,33 | inflammation of organ | 2,37 |
| cell proliferation of tumor cell lines | 2,74 | inflammation of absolute anatomical region | 2,33 |
| cell movement | 2,58 | digestive system cancer | 2,29 |
| invasion of tumor cell lines | 2,42 | digestive organ tumor | 2,25 |
| migration of cells | 2,41 | large intestine neoplasm | 2,21 |
| size of body | 2,31 | adenocarcinoma | 2,18 |
| invasion of cells | 2,21 | organismal death | 2,05 |
| | | | |
| Top decreased Disease and Bio functions (z-score) | | | |
| RNA-Seq | | TMT | |
| conversion of fatty acid | -2,29 | transport of fatty acid | -2,56 |
| congenital anomaly of limb | -2,33 | oxidation of lipid | -2,57 |
| perinatal death | -2,34 | metabolism of retinoid | -2,57 |
| congenital anomaly of digit | -2,38 | translation of mRNA | -2,59 |
| synthesis of terpenoid | -2,41 | conversion of lipid | -2,73 |
| neonatal death | -2,45 | transport of carboxylic acid | -2,74 |
| conversion of lipid | -2,75 | beta-oxidation of fatty acid | -2,77 |
| polydactyly | -3,00 | oxidation of fatty acid | -2,84 |
| organismal death | -3,21 | cell death of osteosarcoma cells | -3,40 |
| morbidity or mortality | -3,35 | transport of molecule | -3,51 |

Tableau 3 La perte de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI induit des altérations dans les fonctions prolifératives et productrices d'énergie des CEI. Le panneau du haut représente les fonctions biologiques et pathologiques les plus probables (Top) induites dans l'analyse des transcrits (ARN-Seq) et des protéines (TMT). Le panneau du bas représente les fonctions biologiques et pathologiques diminuées. (Z-score > 2 et < -2).

Afin d'identifier des régulateurs des voies biologiques de manière prédictive, nous avons utilisé le système URA détaillé plus haut, pour identifier les principaux régulateurs prédits activés ou inhibés. Ces données nous renseignent également sur le type de molécule affectée, soit enzyme, facteur de transcription, cytokine, composé chimique, etc. Nous

avons pu identifier des régulateurs prédits pour être activés au niveau du transcriptome et du protéome, comme le régulateur de la transcription associé à la prolifération MYCN ou MYC. Dans le même sens, MAPK1, ERBB2 et Vegf sont prédits activés au niveau des transcrits. Une prédiction d'activation pour des enzymes peroxysomales impliquées dans la beta-oxydation des lipides, EHHADH et HSD17B4, est observée au niveau du protéome.

Des régulateurs prédits comme étant inhibés à la fois au niveau du transcriptome et du protéome comprennent CFTR et PPARA, associé au métabolisme. PPARGC1 α et HNF4 α sont d'autres régulateurs associés au métabolisme inhibés au niveau des protéines. D'autres molécules comme le Sirolimus, un inhibiteur de mTOR, est le plus fortement prédit comme inactivé au niveau du protéome, corrélant avec l'activation de cette voie dans les CEI sans *Hdac1* et *Hdac2* (Tableau 4)

| Analysis | Upstream Regulator | Molecule Type | Predicted Activation State | Activation z-score | p-value of overlap |
|----------------|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| TMT HDAC1/2 | MYCN | transcription regulator | Activated | 4,885 | 4,01E-20 |
| RNAseq HDAC1/2 | MYC | transcription regulator | Activated | 4,147 | 2,07E-04 |
| RNAseq HDAC1/2 | ERBB2 | kinase | Activated | 3,902 | 1,03E-03 |
| RNAseq HDAC1/2 | bucladesine | chemical toxicant | Activated | 3,128 | 5,74E-04 |
| RNAseq HDAC1/2 | SREBF1 | transcription regulator | Activated | 3,093 | 3,36E-03 |
| RNAseq HDAC1/2 | gentamicin | chemical drug | Activated | 3,091 | 4,47E-04 |
| RNAseq HDAC1/2 | Vegf | group | Activated | 3,077 | 5,29E-03 |
| RNAseq HDAC1/2 | MAPK1 | kinase | Activated | 3,049 | 8,33E-03 |
| RNAseq HDAC1/2 | F3 | transmembrane receptor | Activated | 2,851 | 1,55E-02 |
| TMT HDAC1/2 | gentamicin | chemical drug | Activated | 2,837 | 4,92E-06 |
| RNAseq HDAC1/2 | mibolerone | chemical drug | Activated | 2,818 | 1,41E-02 |
| RNAseq HDAC1/2 | cocaine | chemical drug | Activated | 2,739 | 2,79E-02 |
| RNAseq HDAC1/2 | HIF1A | transcription regulator | Activated | 2,671 | 5,99E-03 |
| TMT HDAC1/2 | nitrofurantoin | chemical drug | Activated | 2,548 | 5,97E-07 |
| TMT HDAC1/2 | EHHADH | enzyme | Activated | 2,219 | 5,49E-05 |
| TMT HDAC1/2 | HSD17B4 | enzyme | Activated | 2,219 | 6,22E-04 |
| TMT HDAC1/2 | deoxycholate | chemical - endogenous mammalian | Activated | 2,194 | 1,78E-02 |
| TMT HDAC1/2 | insulin | group | Activated | 2,108 | 1,47E-02 |
| TMT HDAC1/2 | IL5 | cytokine | Activated | 2,065 | 8,52E-04 |
| TMT HDAC1/2 | TGFB1 | growth factor | Activated | 2,007 | 3,73E-03 |
| TMT HDAC1/2 | isoquercitrin | chemical drug | Activated | 2 | 8,29E-04 |
| RNAseq HDAC1/2 | COMM1 | transporter | Inhibited | -2,433 | 5,28E-02 |
| RNAseq HDAC1/2 | mir-29 | microma | Inhibited | -2,464 | 9,77E-03 |
| RNAseq HDAC1/2 | beta-carotene | chemical - endogenous mammalian | Inhibited | -2,53 | 2,21E-02 |
| RNAseq HDAC1/2 | sterol | chemical - endogenous mammalian | Inhibited | -2,584 | 1,59E-02 |
| RNAseq HDAC1/2 | MKL1 | transcription regulator | Inhibited | -2,623 | 1,81E-02 |
| TMT HDAC1/2 | HNF4A | transcription regulator | Inhibited | -2,706 | 1,89E-12 |
| TMT HDAC1/2 | LHX1 | transcription regulator | Inhibited | -2,729 | 6,47E-05 |
| RNAseq HDAC1/2 | IRF1 | transcription regulator | Inhibited | -2,892 | 2,68E-02 |
| RNAseq HDAC1/2 | PPARA | ligand-dependent nuclear receptor | Inhibited | -2,932 | 2,89E-09 |
| TMT HDAC1/2 | tretinoïn | chemical - endogenous mammalian | Inhibited | -2,981 | 5,91E-07 |
| TMT HDAC1/2 | bezafibrate | chemical drug | Inhibited | -3,073 | 9,89E-07 |
| RNAseq HDAC1/2 | NR3C1 | ligand-dependent nuclear receptor | Inhibited | -3,231 | 1,71E-04 |
| RNAseq HDAC1/2 | CST5 | other | Inhibited | -3,328 | 3,77E-02 |
| TMT HDAC1/2 | ST1926 | chemical drug | Inhibited | -3,357 | 1,09E-04 |
| TMT HDAC1/2 | PPARGC1A | transcription regulator | Inhibited | -3,45 | 3,09E-06 |
| TMT HDAC1/2 | rosiglitazone | chemical drug | Inhibited | -3,596 | 1,64E-04 |
| RNAseq HDAC1/2 | CFTR | ion channel | Inhibited | -4,163 | 2,32E-08 |
| TMT HDAC1/2 | CFTR | ion channel | Inhibited | -4,338 | 3,61E-12 |
| TMT HDAC1/2 | PPARA | ligand-dependent nuclear receptor | Inhibited | -4,364 | 3,22E-20 |
| TMT HDAC1/2 | sirolimus | chemical drug | Inhibited | -4,437 | 9,19E-11 |

Tableau 4 Régulateurs activés ou réprimés suite à la perte de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI. En bleu, les résultats des prédictions d'activation ou de répression des régulateurs pour les transcrits, et en orange, ceux des protéines (Z -score > 2 et < -2).

La double approche protéomique et transcriptomique pour évaluer les changements moléculaires intrinsèques aux CEI suite à la perte de *Hdac1* et *Hdac2* suggère des changements profonds dans une multitude de voies de signalisation, autant au niveau de la prolifération et du métabolisme, surtout lipidique, qu'au niveau des réponses à des stress ou l'environnement, par exemple au niveau des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Même si un plus grand nombre de variations dans les transcrits a été identifié par rapport à l'approche protéomique, cette dernière a révélé des changements associés à une régulation post-transcriptionnelle. Ces changements suggérés, dans les voies de signalisation citées précédemment, devront néanmoins être validés par des approches fonctionnelles.

Il reste que, dans ces deux approches, l'environnement peut affecter la réponse et l'adaptation des CEI. Nous avons notamment observé ce phénomène en caractérisant des similitudes et des différences entre les modèles de délétion embryonnaire et inductible de *Hdac1* et *Hdac2* (Turgeon *et al.*, 2013, Gonneaud *et al.*, 2015)(Chapitre 1). Afin de déterminer le rôle intrinsèque de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI, nous avons élaboré un modèle d'études *in cellulo*, le modèle de culture d'entéroïdes.

4. CHAPITRE 3

Avant-propos

Titre: A SILAC-Based Method for Quantitative Proteomic Analysis of Intestinal Organoids.

Auteurs: Alexis Gonneaud, Christine Jones, Naomie Turgeon, Dominique Lévesque, Claude Asselin, François Boudreau et François-Michel Boisvert

Journal: Scientific Reports; 6:38195, doi: 10.1038/srep38195, 2016

Contribution d'Alexis Gonneaud: 85%

J'ai participé à l'écriture du manuscrit (introduction, matériels et méthodes, résultats et discussion) et à la production de toutes les figures à l'exception de la première.

Résumé de l'article

Les organoïdes relient la culture cellulaire en 3D à la physiologie tissulaire en fournissant un modèle ressemblant à des organes *in vivo*. Les organoïdes intestinaux, à capacité de croissance indéfinie, proviennent de cellules de cryptes intestinales qui recréent la niche épithéliale intestinale renouvelable, et qui se différencient dans un milieu de culture défini. Cette percée technique a été appliquée à de nombreux autres organes, notamment la prostate, le foie, les reins et le pancréas. Nous décrivons ici comment appliquer une approche protéomique quantitative basée sur SILAC pour mesurer les changements d'expression protéique dans des organoïdes intestinaux dans différentes conditions expérimentales. Nous avons généré des milieux SILAC qui permettent aux organoïdes intestinaux de se développer et de se différencier normalement et nous avons confirmé l'incorporation d'acides aminés marqués avec des isotopes. En outre, nous avons traité les organoïdes intestinaux avec un inhibiteur de HDAC de classe I, le CI994, qui affecte la différenciation de ceux-ci. Nous avons démontré la reproductibilité de la quantification protéomique en utilisant cette approche et nous avons identifié des groupes de protéines affectés par l'inhibiteur, et corrélant avec l'inhibition de la croissance et du

développement cellulaire. L'utilisation combinée de la spectrométrie de masse quantitative, de la SILAC et de la culture d'organoïdes nous a permis de mettre au point l'approche SILAC dans un modèle d'organoïdes et de montrer que des variations globales du protéome peuvent être mesurées en culture d'organoïdes.

A SILAC-Based Method for Quantitative Proteomic Analysis of Intestinal Organoids

Alexis Gonneaud, Christine Jones, Naomie Turgeon, Dominique Levesque, Claude Asselin, François Boudreau, François-Michel Boisvert¹

Department of Anatomy and Cell Biology, Université de Sherbrooke, 3201 Jean-Mignault, Sherbrooke, Québec, J1E 4K8, Canada

¹ Corresponding author: François-Michel Boisvert

Phone: 819-821-8000 Ext.75430

Fax: 819-820-6831

Email: Francois.Michel.Boisvert@USherbrooke.ca

KEYWORDS: Intestinal organoids, SILAC, Mass spectrometry, HDAC

ABSTRACT

Organoids have the potential to bridge 3D cell culture to tissue physiology by providing a model resembling *in vivo* organs. Long-term growing organoids were first isolated from intestinal crypt cells and recreated the renewing intestinal epithelial niche. Since then, this technical breakthrough was applied to many other organs, including prostate, liver, kidney and pancreas. We describe here how to apply a SILAC-based quantitative proteomic approach to measure protein expression changes in intestinal organoids under different experimental conditions. We generated SILAC organoid media that allow organoids to grow and differentiate normally, and confirmed the incorporation of isotopically labelled amino acids. Furthermore, we used a treatment reported to affect organoid differentiation to demonstrate the reproducibility of the quantification using this approach and to validate the identification of proteins that correlate with the inhibition of cellular growth and development. With the combined use of quantitative mass spectrometry, SILAC and organoid culture, we validated this approach and showed that large-scale proteome variations can be measured in an “organ-like” system.

MAIN

Several methods for quantifying protein changes by mass spectrometry have been developed. While each have their advantages and disadvantages, SILAC (Stable isotope labelling by amino acids in cell culture) remains a strategic choice to analyze simultaneously multiple samples in different conditions (Mann, 2006). Proteins from samples differentially labelled after metabolic incorporation of isotopic amino acids are pooled before further sample processing, minimizing bias due to handling, and thus increases reproducibility over chemical labelling or label-free quantification approaches (Bakalarski et Kirkpatrick, 2016). However, SILAC is not applicable to non-cultured samples such as clinical samples, animals and certain organisms requiring complex culture media.

Three-dimensional (3D) cell culture strategies have been developed to better reflect tissue characteristics in both normal and diseased physiological conditions (Clevers, 2016, Dedhia *et al.*, 2016). Significant progress has been recently made in defining optimal conditions to allow growth, expansion and differentiation of intestinal epithelial stem cells (Sato *et al.*, 2011, Yin *et al.*, 2014) as well as several other tissue stem cells (McCracken *et al.*, 2014, Dye *et al.*, 2015, Fatehullah *et al.*, 2016). Unlike cancer cell lines, organoids maintain all the variables specific to the original epithelial cell, including the tumor cell (van de Wetering *et al.*, 2015). As a result, organoid culture is becoming the preferred strategy in personalized medicine, as it allows the testing of existing and experimental treatments on samples with distinct genomic individual signatures (Hynds et Giangreco, 2013, Barker, 2014). The ability to culture these mini-organs raises the question of their use for isotope incorporation to perform SILAC based quantitative proteomics. If successful, this would allow accurate protein quantification in a physiologically relevant system (Figure 1).

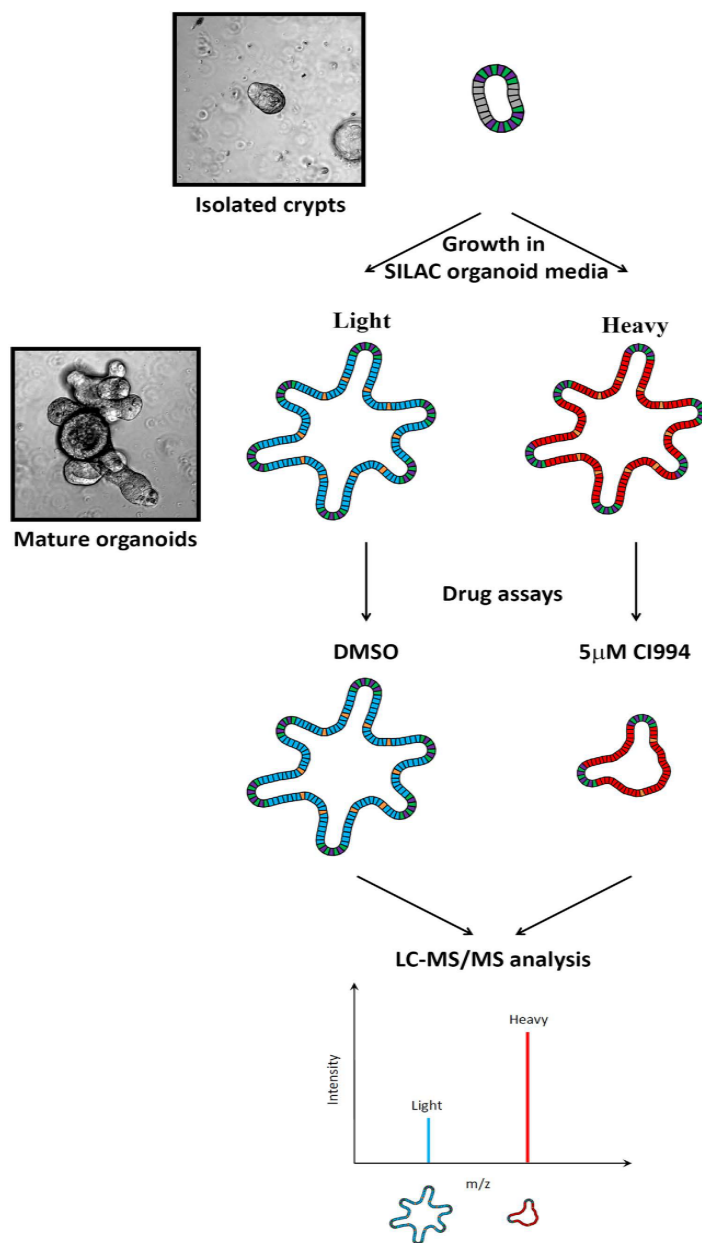


Figure 25 Figure 1 - Experimental protocol of SILAC labelling of organoids and mass spectrometry analysis. Outline of the SILAC mass spectrometry experimental design for organoids. Intestinal organoids from isolated crypts were grown in different SILAC media for 20 days. Different drugs or treatment can then be used and SILAC allows quantification of changes in protein expression. The effect of a class I HDAC inhibitor, CI994, was used to validate the feasibility of this approach.

To address the feasibility of a proteomic approach on organoids, there was a need to determine the extent of contamination from Matrigel proteins, which are needed for organoid growth. Indeed, Matrigel proteins could mask the proteins isolated from the embedded biological material (Hughes *et al.*, 2010). Organoids were isolated from Matrigel with the non-enzymatic MatriSpense dissociation method. Several washes with cold PBS promoted the removal of Matrigel and the isolation of intact organoids, prior to solubilisation of proteins and in-solution tryptic digestion, LC-MS/MS analysis and protein identification. Results showed that while Matrigel proteins, such as collagens and laminins, were distinguished, over 2500 proteins were identified in these purified organoids, demonstrating that the presence of Matrigel did not hinder the identification of proteins from organoids (Supplementary Table 1).

In order to perform SILAC quantification, near complete isotope incorporation must be achieved in the growth media. It is thus essential that all components of the culture media provide the correct isotope with no contribution from other isotopic amino acids. To create a 'SILAC organoid' media, R-spondin 1- or Noggin-expressing 293T cells (Ootani *et al.*, 2009) were grown in three different SILAC media containing arginine and lysine, either with normal isotopes of carbon and nitrogen (i.e. $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$, light), L-arginine- $^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$ and L-lysine- $^2\text{H}_4$ (medium) or L-arginine- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ and L-lysine- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ (heavy). Conditioned media were harvested, filtered and mixed to a final contribution of 20% of R-spondin 1 conditioned medium, 10% of Noggin conditioned medium and 70% of Advanced DMEM/F-12 Flex medium supplemented with the same isotopic amino acids. Organoids were cultured in these light, medium or heavy SILAC organoid media for several passages performed at approximately every 5 to 7 days of culture. Organoids were harvested at 10, 15, 20, 25 and 30 days of culture to establish an incorporation curve of SILAC isotopes (Figure 2a). Organoids isolated from different media at different times were mixed 1:1:1 and trypsin-digested prior to mass spectrometry analysis (Figure 2a and Supplementary Table 2). We observed an increase in isotope incorporation until the curve reached a plateau at >90% of incorporation, for both heavy and medium isotopes (Figure 2a). The data indicate that nearly complete SILAC incorporation in organoids requires approximately 20 days of incorporation (Figure 2a), which corresponds to four passages in SILAC organoid media.

We then determined whether this process could be accelerated by using frozen organoids which already had completed SILAC incorporation. Organoids were grown in the different SILAC media for 20 days, then frozen in SILAC conservation media containing dialyzed serum, DMSO and the desired SILAC Advanced DMEM/F-12 Flex media for long term storage in liquid nitrogen. After two weeks, organoids were thawed and re-introduced immediately in SILAC media to assess organoid growth for 10 days. Organoids appeared normal, without any changes in growth. Proteins were then analyzed by mass spectrometry to determine the incorporation ratios, which still indicated an enrichment of >90%, as above (data not shown).

To determine whether protein expression changes could be quantified in SILAC-treated organoid cultures, we determined the effect of CI994, a class I HDAC inhibitor for Hdac1, 2 and 3 (Bantscheff *et al.*, 2011). HDAC inhibitors have been shown to affect intestinal epithelial cell growth and differentiation in intestinal organoid cultures (Yin *et al.*, 2014). Organoids were treated during 5 days with either DMSO or 5 μ M of CI994. Macroscopically, CI994-treated organoids were smaller, with decreased crypt-budding formation, indicating potential changes in the coordination of HDAC-dependent mechanisms controlling self-renewal and differentiation of the intestinal epithelium (Figure 2b). To determine reproducibility, two replicates from the initial organoid culture, including sample preparation and protein identification by mass spectrometry, were performed. A Pearson coefficient of 0.85 was measured for the treatment with CI994, indicating a very strong reproducibility when comparing populations of organoids (Figure 2c and Supplementary Table 3). This allowed the identification of proteins that were consistently upregulated or downregulated following CI994 treatment.

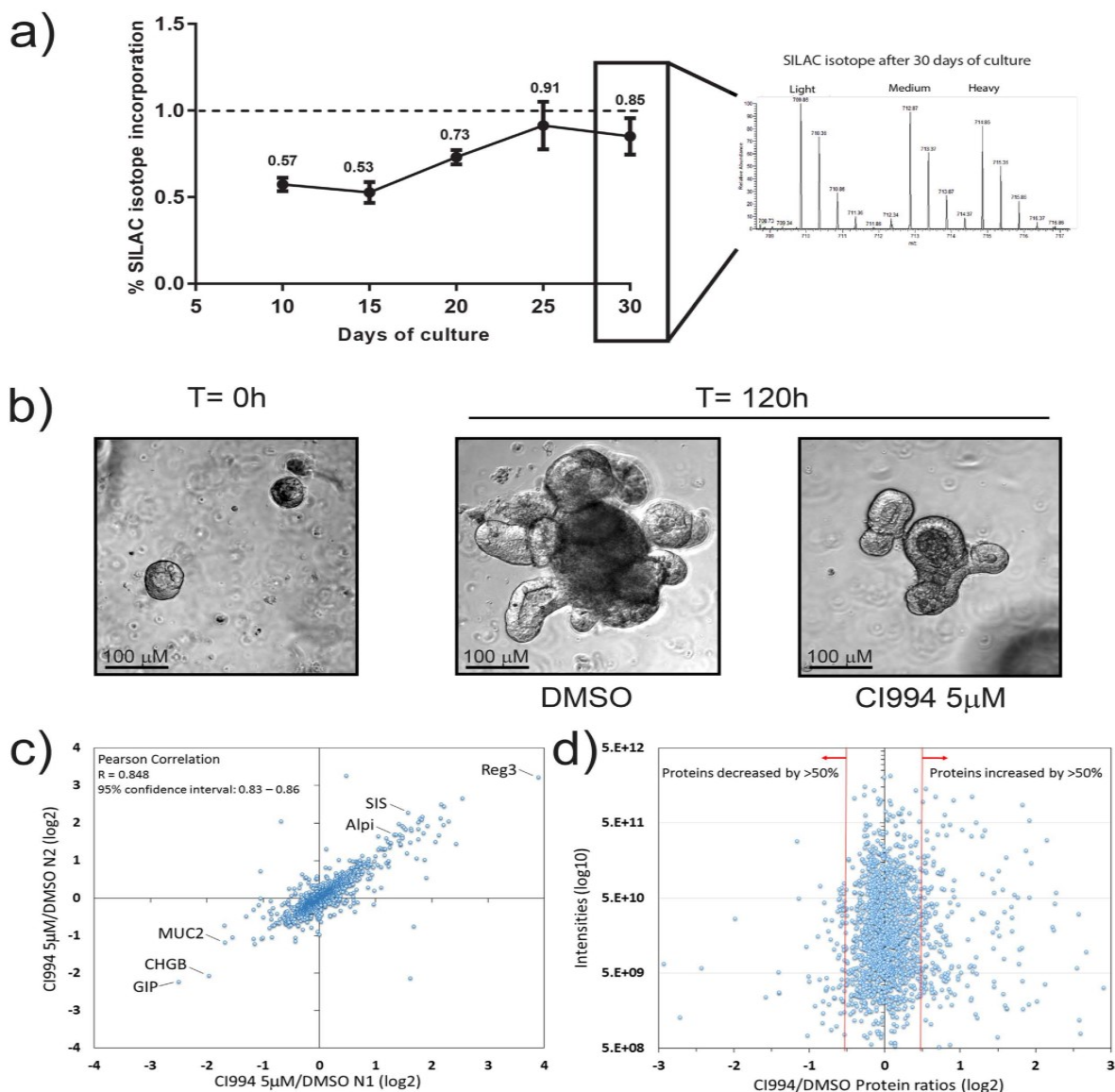


Figure 26 Figure 2 - Incorporation of SILAC isotopes in organoid cultures and effect of the class I HDAC inhibitor CI994 on organoid growth and development. a) Organoids were grown continuously in SILAC medium containing arginine and lysine with light isotopes of carbon, hydrogen and nitrogen (i.e. $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$) (light), or with medium containing L-arginine- $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_4$ and L-lysine- $^{13}\text{C}_6$ - $^{15}\text{N}_2$ (heavy). Intestinal organoids were amplified and split every five days. From days 10 to 30, levels of isotope incorporation were evaluated by mass spectrometry analysis by combining equal amounts of organoid lysates prior to sample processing, protein identification and quantification. **b)** Micrograph of intestinal organoids before and after 5-day treatment with either DMSO or CI994 at 5 μM . Scale bars represent 100 μm . **c)** Evaluation of reproducibility between the different

assays: ratios from one experimental repeat (N1) CI994 5 μ M/DMSO (x axis) versus the second repeat (N2) CI994 5 μ M/DMSO (y axis) for identified proteins. A correlation between N1 and N2 CI994 5 μ M/DMSO experiments was observed with Pearson correlation ($R=0.848$). **d**) The average CI994/DMSO ratios of proteins over the average peptide intensities, to identify proteins with an increase or decrease in expression following treatment with the HDAC inhibitor CI994.

To confirm the physiological relevance of protein expression changes, we characterized the proteins with the largest increase or decrease following treatment with CI994 (Figure 2d). Gene ontology analysis of the biological processes, enriched in the proteins increased by more than 50% using DAVID (Dennis *et al.*, 2003), identified processes mainly associated with metabolic pathways such as oxydoreduction (p-value of $29e-19$) and carbohydrate catabolic process (p-value of $6.60e-10$) as well as several processes implicated in the metabolism and absorption of complex sugars (Supplementary Table 4 and Figure 3a). For proteins decreased by 50%, associations with DNA replication initiation (p-value of $1.30e-7$), cell cycle regulation (p-value of $6.0e-5$), DNA packaging (p-value of $8.3e-7$) and chromosome organization (p-value of $6.3e-6$) were consistent with the observation that organoids were smaller and that proliferating crypt-budding structures were less developed after 5 days of treatment with the HDAC inhibitor (Supplementary Table 4 and Figure 3a). In addition, altered enterocyte differentiation was observed in CI994-treated organoids. For example, antimicrobial Reg3 β and Reg3 γ proteins, as well as sucrase-isomaltase (Sis) and intestinal alkaline phosphatase, were increased. In contrast, goblet (Muc2) and endocrine (ChgB and GIP) proteins were reduced (Figure 2c). This was consistent with the findings that wide inhibition of HDAC activities reduces secretory cell lineage differentiation (Yin *et al.*, 2014).

These observations were confirmed by quantitative PCR for differentially expressed proteins after CI994 treatment. For example, ChgB and Muc2 mRNA expression was decreased in CI994-treated organoids, whereas Reg3 β and Sis mRNA expression was increased (Figure 3b). Moreover, Reg3 β and Sis protein levels were increased, as determined by Western blot analysis, thus confirming the proteomic data showing an

increase in Reg3 β and Sis proteins in CI994-treated organoids (Figure 3c and Supplementary Table 4).

a)

| GOTERM_BP_FAT following CI994 treatment | | | |
|--|----------|--|----------|
| Protein increase by > 50% | P-value | Protein decrease by < 50% | P-value |
| oxidation reduction | 2,90E-19 | DNA replication initiation | 1,30E-07 |
| alcohol catabolic process | 2,40E-12 | DNA geometric change | 4,50E-07 |
| carbohydrate catabolic process | 6,60E-10 | DNA packaging | 8,30E-07 |
| cellular carbohydrate catabolic process | 1,00E-08 | chromosome organization | 6,30E-06 |
| hexose metabolic process | 2,10E-08 | DNA unwinding during replication | 2,10E-05 |
| glucose catabolic process | 5,60E-08 | DNA-dependent DNA replication | 2,70E-05 |
| hexose catabolic process | 5,60E-08 | cell cycle | 6,00E-05 |
| monosaccharide catabolic process | 7,70E-08 | DNA replication | 1,30E-04 |
| monosaccharide metabolic process | 9,10E-08 | chromosome condensation | 1,90E-04 |
| glucose metabolic process | 2,20E-07 | chromatin assembly or disassembly | 2,40E-04 |
| generation of precursor metabolites and energy | 5,40E-07 | RNA processing | 3,90E-04 |
| peptide metabolic process | 2,40E-06 | chromatin organization | 1,20E-03 |
| glutathione metabolic process | 4,10E-06 | negative regulation of gene expression | 1,20E-03 |
| polyol metabolic process | 5,00E-06 | regulation of protein modification process | 1,60E-03 |
| alditol metabolic process | 5,00E-06 | gene silencing | 3,10E-03 |
| glycolysis | 5,70E-06 | regulation of transcription | 3,20E-03 |

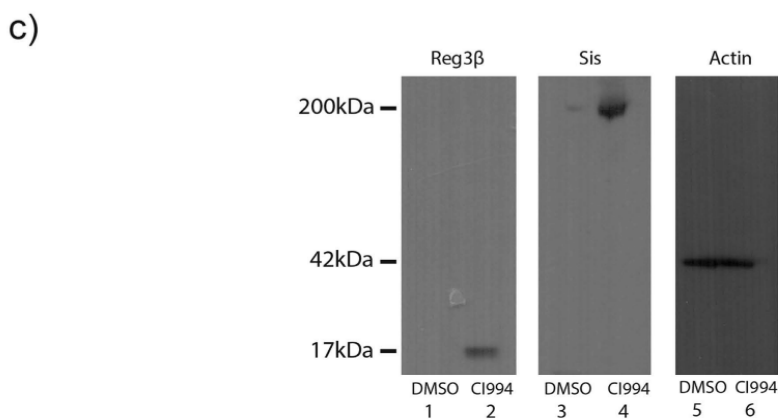
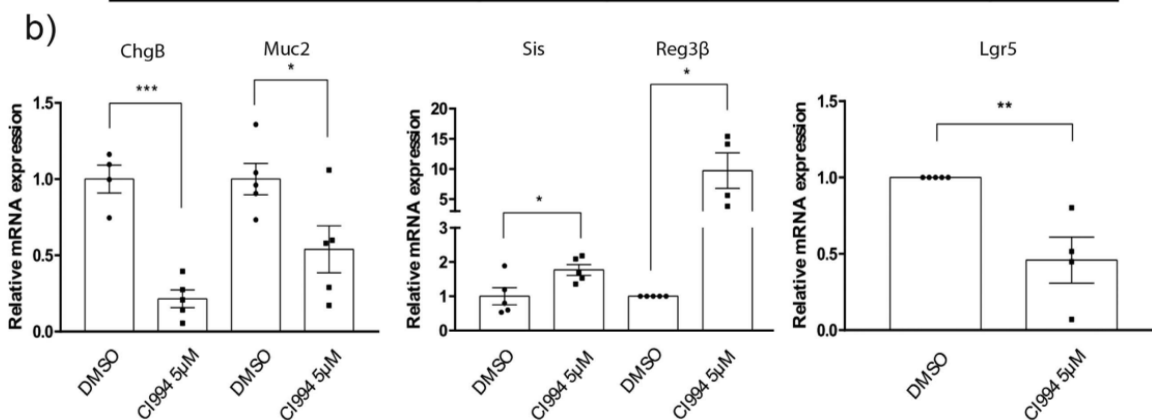


Figure 27 Figure 3 - CI994 treatment affects organoid differentiation and development processes. **a)** Gene ontology term enrichment of biological processes for decreased and induced proteins (<50% and >50%) in CI994-treated organoids. Gene ontology analysis was done using the EASE Score from DAVID 2.0 ($p\text{-value} \leq 0.05$). **b)** Total RNAs were isolated from organoids treated with or without CI994. Expression levels of selected genes, namely ChgB, Muc2, Reg3 β , Sis and Lgr5 were measured by qPCR in comparison to PBGD expression as a control. Results represent the mean \pm S.E.M. (* $P < 0.05$). Statistical significance was determined by unpaired t tests. **c)** Reg3 β and Sis protein expression following CI994 treatment was monitored by Western blot analysis, with actin as a protein loading control.

Interestingly, mRNA levels of the Lgr5 stem cell marker were decreased following CI994 treatment (Figure 3b), suggesting reduced numbers of stem cells and correlating with the smaller and less developed aspect of organoids observed. Interestingly, this effect on Lgr5 expression is different from VPA treatment (Yin *et al.*, 2014). This could be explained by different HDAC inhibitory properties of both compounds. Both VPA and CI994 are considered class I HDAC inhibitors, with little activity on class II HDAC. While VPA inhibits more efficiently Hdac1 and Hdac2 rather than Hdac3, CI994 targets similarly Hdac1, Hdac2 and Hdac3 (Bantscheff *et al.*, 2011, Wagner *et al.*, 2013). Thus, this suggests that residual class I HDAC activity, through Hdac3, may be necessary to maintain Lgr5-expressing cell pools. However, inhibition of the three Hdac isoforms with CI994 could lead to growth arrest and subsequent organoid growth defects.

Our data demonstrate the feasibility of using SILAC for quantitative proteomic studies with organoids. We describe a culture method to ensure >90% isotopic incorporation. This methodology allows the quantification of changes at the proteome level in 3D cell cultures during cellular differentiation, or in response to different inhibitors and drugs. With the recent promise of adapting organoid technology for precision medicine (Huang *et al.*, 2015), this new methodology will become advantageous to quantify global changes in protein expression, thereby identifying novel signalling pathways and targets upon defined environmental context.

METHODS

Production of SILAC Noggin and R-spondin 1 conditioned media. Noggin-Fc and R-spondin 1-Fc were produced using 293T cell lines stably expressing R-spondin 1-Fc (kindly provided by Dr. C. Kuo, Stanford University, USA) or Noggin-Fc (kindly provided by Dr. G.R. van den Brink, Hubrecht Institute, The Netherlands). These cells were cultured in T75 cm² flasks with DMEM (without arginine or lysine) medium supplemented with 10% FBS, GlutaMAX (1X), HEPES (1X), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Arginine and lysine were added in either light (Arg0, Sigma, A5006; Lys0, Sigma, L5501), medium (Arg6, Cambridge Isotope Lab (CIL), CNM-2265; Lys4, CIL, DLM-2640), or heavy (Arg10, CIL, CNLM-539; Lys8, CIL, CNLM-291) forms to final concentrations of 28 µg/ml for arginine and 49 µg/ml for lysine. Selective antibiotic puromycin (10 mg/mL) for Noggin-Fc production or Zeocin (10 mg/mL) for R-spondin 1-Fc production were added in the media during cell passages. Selection was stopped when cells were amplified in T175 cm² flasks. At confluence, cells were amplified in Advanced DMEM/F12 medium (without arginine or lysine) and supplemented with GlutaMAX (1X), HEPES (1X), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) for 7 days, as well as the appropriate SILAC isotopes. Medium was then removed and centrifuged at 1000 rpm for 5 min. Supernatants containing R-spondin 1-Fc or Noggin-Fc were filtered through a 0.22 µm membrane and stored at -80°C. Expression of R-spondin or Noggin was measured by dot blots through the Fc using secondary antibodies coupled to HRP.

Organoid culture. Two-month-old mice were used for intestinal epithelial cell isolation. For each culture, crypts were isolated from one mouse jejunum with EDTA. Animal investigations and the experimental protocol were approved by the Institutional Animal Research Review Committee of the Université de Sherbrooke (protocol 360-14B), and all methods were carried out in accordance with regulations. Briefly, jejunum was opened longitudinally and rinsed in a Petri dish with cold PBS 1X. The intestine was then cut into pieces of 5 mm in length and fragments washed by stirring in a 50 mL Falcon tube containing PBS 1X. Intestinal fragments were transferred in a 50 mL Falcon tube containing 20 mL of 30 mM EDTA and incubated for 5 min on ice with gentle stirring. Fresh EDTA was substituted and further incubation was done for 20 min on ice. EDTA

was replaced with 40 mL of PBS 1X. The Falcon tube was shaken vigorously for 5-8 min or until dissociated crypts were visualized in the solution as determined under a microscope. The solution was filtered using a 70 μ m cell strainer with crypts going through as opposed to residual villi being retained by the filter. Crypts were then centrifuged at 150 x g for 5 min. The cell pellet was washed twice with 25 mL of Advanced DMEM/F-12 medium. A second centrifugation was performed at 150 x g for 5 min. The pellet was then resuspended in 1 mL of Matrigel (BD Corning) and plated in a 48-well plate (Corning Costar) (20 μ L/well).

Organoid SILAC media. The organoid SILAC media added to Matrigel embedded cells consisted of 70% SILAC Advanced DMEM/F-12 Flex media (ThermoFisher) supplemented with 1,25 mM N-acetylcysteine (Sigma), 50 ng/mL EGF (Life Technologies), B27 supplement 1X (Life Technologies), N2 supplement 1X (Life Technologies), 10% SILAC Advanced DMEM/F-12 Noggin media, and 20% SILAC Advanced DMEM/F-12 R-Spondin 1. All culture medium contained arginine and lysine, either with the normal light isotopes of carbon, hydrogen and nitrogen (*i.e.* $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$) (light – “L”), or else with L-arginine- $^{13}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$ and L-lysine- $^2\text{H}_4$ (medium – “M”) or with medium containing L-arginine- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ and L-lysine- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ (heavy – “H”). In some experiments, organoids were treated during 5 days with 5 μ M CI994 (Cayman Chemical), a class I HDAC inhibitor. CI994 was diluted in DMSO and control organoids were supplemented with DMSO. We chose a CI994 concentration resulting in the most apparent phenotypic effect on organoid growth and appearance, in order to validate our method.

Incorporation assay. Organoids (average of 250 organoids/well) were maintained in SILAC organoid light, medium or heavy media for several passages (every 5 to 7 days of culture) to allow SILAC isotope incorporation. Samples were collected at different time points (10, 15, 20, 25 and 30 days of culture) and analyzed by mass spectrometry to estimate incorporation by using medium/light and heavy/light ratios.

Conservation and re-culturing assay. Organoids grown in SILAC organoid light, medium or heavy media for 20 days were harvested and resuspended in SILAC

conservation media composed of 70% dialyzed fetal bovine serum (Invitrogen), 15% DMSO and the desired SILAC Advanced DMEM/F-12 Flex light, medium or heavy media, stored at -80°C overnight before being transferred in liquid nitrogen. After 2 weeks, frozen organoids were thawed and grown as described before in the different SILAC media for 10 days (technically for a total of 30 days). Organoids were collected and analysed by mass spectrometry to confirm isotope incorporation.

Sample collection. To assess level of isotopic incorporation and variability among CI994 treatments, organoids were processed for HPLC-MS/MS analysis. The media was removed and each well was washed with cold PBS 1X. 300 µL of MatriSpense (Corning) was added per well and incubated for 30 min at 4°C. Organoids were then collected in Protein LoBind tube (Eppendorf) and centrifuged at 7000 rpm for 3 min at 4°C. The supernatant was removed and the cells were washed three times with cold PBS 1X, by centrifugation at 7000 rpm for 3 min at 4°C. Cell pellets were then frozen at -80°C prior to mass spectrometry preparation and analysis.

In-solution digestion. Frozen organoid samples were resuspended in a fresh 10 mM HEPES (pH 7.0-7.6), 8 M urea solution. Proteins were reduced in 3.24 mM dithiothreitol (DTT) and alkylated in 13.5 mM iodoacetamide. The final concentration of urea was lowered to 2 M with the addition of 50 mM ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃). After BCA dosage, 15 µg of light and heavy condition samples were pooled and digested by trypsin prior to mass spectrometry analysis.

Gel electrophoresis and in-gel digestion. For each time point, proteins were reduced in 10 mM dithiothreitol (DTT), alkylated in 50 mM iodoacetamide prior to boiling in loading buffer, then separated by one-dimensional SDS-PAGE (4–12% Bis-Tris Novex mini-gel, Invitrogen) and visualized by colloidal Coomassie staining (SimplyBlue Safestain, Invitrogen). The entire protein gel lanes were excised and cut into 8 slices each. Every gel slice was subjected to in-gel digestion with trypsin (Drissi *et al.*, 2015). The resulting tryptic peptides were extracted by 1% formic acid, then 100% acetonitrile, lyophilized in a speedvac, and resuspended in 1% formic acid.

Liquid chromatography-tandem MS (LC-MS/MS). Trypsin digested peptides were separated using an Ultimate U3000 (Dionex Corporation) nanoflow LC-system. Ten microliters of sample (a total of 2 μ g peptide) were loaded with a constant flow of 4 μ l/min onto a PepMap C18 trap column (0.3 mm id \times 5 mm, Dionex Corporation). Peptides were then eluted onto a PepMap C18 nano column (75 μ m \times 50 cm, Dionex Corporation) with a linear gradient of 5–35% solvent B (90% acetonitrile with 0.1% formic acid) over 240 min with a constant flow of 200 nl/min. The performance liquid chromatography (HPLC) system was coupled to an Orbitrap Q Exactive, via an EasySpray source. The spray voltage was set to 1.5 kV and the temperature of the column was set to 40°C. Full scan MS survey spectra (m/z 350–1800) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 70,000 after accumulation of 1,000,000 ions. The ten most intense peptide ions were fragmented by collision-induced dissociation (normalized collision energy 35% with a resolution of 17,500) after the accumulation of 50,000 ions. Maximal filling times were 250 ms for the full scans and 60 ms for the MS/MS scans. Precursor ion charge state screening was enabled and all unassigned charge states as well as singly, 7 and 8 charged species were rejected. The dynamic exclusion list was restricted to a maximum of 500 entries with a maximum retention period of 60 s and a relative mass window of 10 ppm. The lock mass option was enabled for survey scans to improve mass accuracy. The lock mass option was enabled and data were acquired using the XCalibur software.

Quantification and bioinformatic analysis. Protein identification and SILAC quantification were performed with MaxQuant version 1.5.2.8 (Cox et Mann, 2008) using the Uniprot mouse protein database containing 89,422 proteins, to which 175 commonly observed contaminants and all the reversed sequences had been added. The initial mass tolerance was set to 7 p.p.m. and MS/MS mass tolerance was 0.5 Da. Enzyme was set to Trypsin/P with 2 missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteine was searched as a fixed modification, whereas N-acetyl protein and oxidation of methionine were searched as variable modifications. Identification was set to a false discovery rate of 1%. To achieve reliable identifications, all proteins were accepted based on the criteria that the number of forward hits in the database was at least 100-fold higher than the number of reverse

database hits, thus resulting in a false discovery rate of less than 1%. A minimum of 3 peptides were quantified for each protein, and quantification performed only in the presence of 3 ratio counts. The mass spectrometry data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD004607.

QPCR analysis. 2 ng of cDNAs, prepared from CI994-treated and untreated organoid mRNAs, were used for qPCR using the RT2 SYBR Green ROX qPCR Master Mix (Qiagen), and Up and Down oligonucleotides specific to ChgB, Muc2, Reg3 β , Lgr5 and Sis were used for amplification (Supplementary Table 5). Relative quantification was assessed by Porphobilinogen deaminase (Pbgd) amplification. Ten min incubation at 95 °C was followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at 60 °C and 20 s at 72 °C. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. Statistical significance was determined by performing unpaired t-tests.

Western blot analysis. Whole organoid lysates were prepared with a lysis buffer containing 8 M urea. 15 μ g of proteins from each CI994-treated and untreated condition were separated on 4–12% Bis-Tris NuPage precast gels (Life Technologies) and transferred to PVDF blotting membranes (Roche Applied Science). Western blotting was performed as described previously (Gonneaud *et al.*, 2015). Antibodies used were: goat anti-Reg3 β (AF1996, R&D Systems), goat anti-SIS (sc-27603, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-actin (MAB-1501, EMD Millipore), donkey anti-goat (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) and goat anti-mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology). Immune complexes were detected with Amersham ECLTM Western blotting detection reagents (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. Pearson correlation coefficients were measured to evaluate the correlation between the two repeats of the CI994 5 μ M/DMSO experiments (figure 2c). Gene ontology analysis was done using the EASE score (a modified Fisher Exact P-Value) from DAVID 2.0 (p -value \leq 0.05) (figure 3a). Results of qPCR analysis are expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical significance was determined using an unpaired t tests (figure 3b).

Acknowledgements

F.M.B funding: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number 418404 to FMB). F.B. funding: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number 262094 to F.B.). C.A. funding: CR-CHUS and Faculté de médecine et des sciences de la santé. F.M.B., F.B. and C.A. are members of the FRQS-funded “Centre de Recherche du CHUS”.

The authors thank Dr C. Kuo (Stanford University, USA) for providing the R-spondin 1 producing cell line and Dr G.R. van den Brink (Hubrecht Institute, The Netherlands) for providing the Noggin producing cell line.

ADDITIONAL INFORMATION**Competing financial interests**

The authors declare no competing financial interests.

5. CHAPITRE 4 : HDAC1 et HDAC2 dérèglent les processus métaboliques et de défense dans les entéroïdes.

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Culture d'entéroïdes dans le milieu SILAC et spectrométrie de masse

Des cryptes de jéjunum sont isolées à partir de souris de 3 mois délétées dès l'âge embryonnaire pour *Hdac1* et/ou *Hdac2* dans l'épithélium intestinal ou encore délétées pour *Hdac1* et *Hdac2* de façon inductible par le tamoxifène (Chapitre 1). Pour chaque mutant, les cryptes sont isolées à partir d'un jéjunum de souris avec une solution d'EDTA. Brièvement, le jéjunum est ouvert longitudinalement et rincé avec du PBS 1X froid. L'intestin est ensuite découpé en morceaux de 5 mm de longueur et les fragments lavés avec du PBS 1X. Les fragments intestinaux sont transférés dans un tube Falcon de 50 ml contenant 20 ml d'EDTA 30 mM et incubés pendant 5 min sur de la glace avec une agitation douce. La solution d'EDTA est changée pour une nouvelle solution d'EDTA pendant 20 min. La solution est ensuite remplacée par 40 ml de PBS 1X. Le tube Falcon est secoué vigoureusement pendant 5 à 8 min ou jusqu'à ce qu'une bonne quantité de cryptes dissociées soit observée au microscope. La solution est filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire de 70 µm (Falcon Corning, Durham, NC, USA) afin de ne récupérer que les cryptes. Les cryptes sont ensuite centrifugées à 150 x g pendant 5 min. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec 25 ml de milieu Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) contenant des antibiotiques (Pen/Strep) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). Une dernière centrifugation est effectuée à 150 x g pendant 5 min. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 mL de Matrigel (BD Corning, BD Corning, Durham, NC, USA) et mis en culture dans une plaque de 48 puits (Costar Corning, Durham, NC, USA) (20 µL/puits). Les cryptes mises en culture dans du Matrigel forment des entéroïdes dans un milieu de culture ENR composé de milieu Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 1,25 mM N-acétylcystéine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 50 ng/mL EGF (Life Technologies), B27 1X (Life Technologies), N2 1X (Life Technologies), en présence de milieu SILAC contenant des isotopes légers d'arginine et lysine (RO, KO) pour les entéroïdes contrôle, moyens (R6, K4) pour les entéroïdes *Hdac1*^{-/-} et lourds (R10, K8) pour

les entéroïdes *Hdac2*^{-/-}. Après 30 jours de culture, les entéroïdes sont récoltés puis subissent les différents traitements afin de pouvoir être analysés par spectrométrie de masse (Chapitre 3). L'ensemble des étapes suit le protocole décrit dans le chapitre 3. Les entéroïdes délétés pour Hdac1 et 2 ont été cultivé dans du milieu ENR standard. Pour induire la délétion dans le modèle inductible *Hdac1/2*^{-/-} Villine-Cre^{ER}, du 4-hydroxy Tamoxifène 0,5 µM (OHT) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) est ajouté au milieu ENR pendant tout le temps de la culture, soit 5 jours puis 3 jours supplémentaires après le passage. L'effet de la perte de HDAC1 et 2 dans ces deux derniers modèles d'entéroïde a été observé au microscope Leica DC300, grossissement 20x (Leica Microsystems Inc., Concord, ON, Canada).

5.1.2 Extraction des protéines et immunobuvardage

Les entéroïdes sont récoltés selon le protocole décrit dans le chapitre 3. Brièvement, les puits contenant les entéroïdes sont lavés au PBS 1X, suivi par l'ajout de la solution Cell Recovery (Corning) pour dissoudre le Matrigel et extraire les entéroïdes. Les entéroïdes sont récupérés et lysés dans du tampon Laemmli 1 X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol) pour extraire les protéines totales (Turgeon *et al.*, 2008, Turgeon *et al.*, 2013). La trousse de dosage des protéines au BCA est utilisée (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Les protéines sont séparées sur un gel SDS-polyacrylamide 10% puis électrotransférées sur une membrane de PVDF (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada). Les membranes sont ensuite bloquées dans une solution TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,05% Tween-20) contenant 5% de lait, pendant 1 h. Puis, les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C avec agitation, en présence d'anticorps primaires dirigés contre HDAC1 ou HDAC2 ((Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) ou contre l'actine (Millipore, Billerica, MA, USA). Les membranes sont lavées 3 fois pendant 10 min dans du TBS-T 1 X, puis incubées pendant 1 h à température ambiante avec agitation, avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase de raifort (HRP), soit anti-lapin (sc-2004), soit anti-souris (sc-2005), dilué 1000 fois dans la solution de blocage (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Les membranes sont de nouveau lavées 3 fois pendant 10 min avec du TBS 1X contenant 0,05% Tween-20. Les complexes anticorps-antigènes sont révélés avec la trousse de détection Amersham ECLTM

(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) par autoradiographie (Films HyBlot ES, Denville Scientific Inc., Metuchen, NJ, USA).

5.1.3 RT-PCR semi-quantitative

Les ARN totaux isolés des entéroïdes sans *Hdac1* ou sans *Hdac2* sont isolés avec la trousse RNeasy plus Mini (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Les ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN, avec comme amorce l'oligo dT15 et la transcriptase inverse Superscript II (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada). Les ADNc sont amplifiés avec la trousse Taq PCR Master (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) avec des amorces PCR correspondant aux séquences des gènes murins de *Hdac1* et *Hdac2* (HDAC1 : sens - 5'-TGAGGACTGTCCGGTGTGGT-3' et antisens 5' CACACTTGGCGTGTCCCTTG-3' (563 pb), HDAC2 : sens 5'-ATGGCGTACAGTCAAGGAGG-3' et antisens 5'-GGTCATCACGCGATCTGTTG-3') (588 pb)) pour confirmer la présence ou non du transcrit. L'amplification comprend plusieurs étapes, notamment un premier cycle à 94°C pendant 5 min ; 30 cycles de 1 min à 94°C, 45 sec à 62°C et en diminuant de 0,3°C à chaque cycle ; 1 min à 72°C ; un cycle final de 1 min à 94°C et 10 min à 72°C. La quantification relative est déterminée par amplification de l'ADNc de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH : Sens - 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGAC-3' et antisens 5'-GTGAAGGTCGGTGTGAACGG-3') (496 pb). Les produits de PCR amplifiés sont séparés sur un gel d'agarose 1,5% et visualisés par coloration avec une solution RedSafe™ (Froggabio, North York, ON, Canada).

5.1.4 Analyse bio-informatique

Une fois trié, les données comparatives de protéomique (SILAC) pour les entéroïdes sans *Hdac1* ou *Hdac2*, et contrôle sont analysées avec le logiciel DAVID 2.0 pour l'ontologie des gènes (Dennis *et al.*, 2003) pour identifier les processus biologiques affectés suite à la perte de HDAC1 ou de HDAC2, avec une p-value < 0,05 et le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>). Ce logiciel permet d'identifier les principales voies biologiques modifiées, les liens et les variations entre les différents échantillons et également de prédire

l'activation de certaines voies (URA – Z-score) par recoupage et intégration/interrogation avec les bases de données IPA (Kramer *et al.*, 2014).

5.2 Résultats

Pour déterminer l'effet intrinsèque de HDAC1 ou HDAC2 sur les CEI, nous avons d'abord mis en culture des CEI obtenues à partir des cryptes de jéjunum des souris Villine-Cre sans *Hdac1* et *Hdac2*. Nous avons observé que les entéroïdes mutants ne survivaient pas plus de trois jours en culture comparativement aux entéroïdes contrôle (Figure 28). Nous avons ensuite mis en culture des entéroïdes à partir de cryptes de jéjunum de souris Villine-Cre^{ER} *Hdac1* et *Hdac2*. Nous avons induit la délétion en ajoutant de l'OHT au milieu de culture. Des traitements de huit jours au total (5 jours en culture puis 3 jours après le passage des entéroïdes) ont mené à la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* (Figure 28), et ont entraîné un arrêt de la croissance des entéroïdes, contrairement aux entéroïdes contrôle (Figure 28). Ces résultats suggèrent que des composants de l'environnement de la muqueuse intestinale, altérée suite à la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* dans l'épithélium, pourrait jouer un rôle dans la survie et la croissance des CEI sans *Hdac1* et *Hdac2* chez l'animal.

semblent plus "fragiles" durant les passages (données non montrées). Cela peut être dû à la compensation de la perte de l'un par rapport à l'autre. Nous avons validé l'absence de *Hdac1* ou *Hdac2*, autant au niveau de l'ARNm que de la protéine (Figure 29). Puis, nous avons procédé à la mise en culture dans un milieu SILAC afin de déterminer le protéome de ces organoïdes, selon la technique que nous avons établie (Chapitre 3) (Gonneaud *et al.*, 2016).

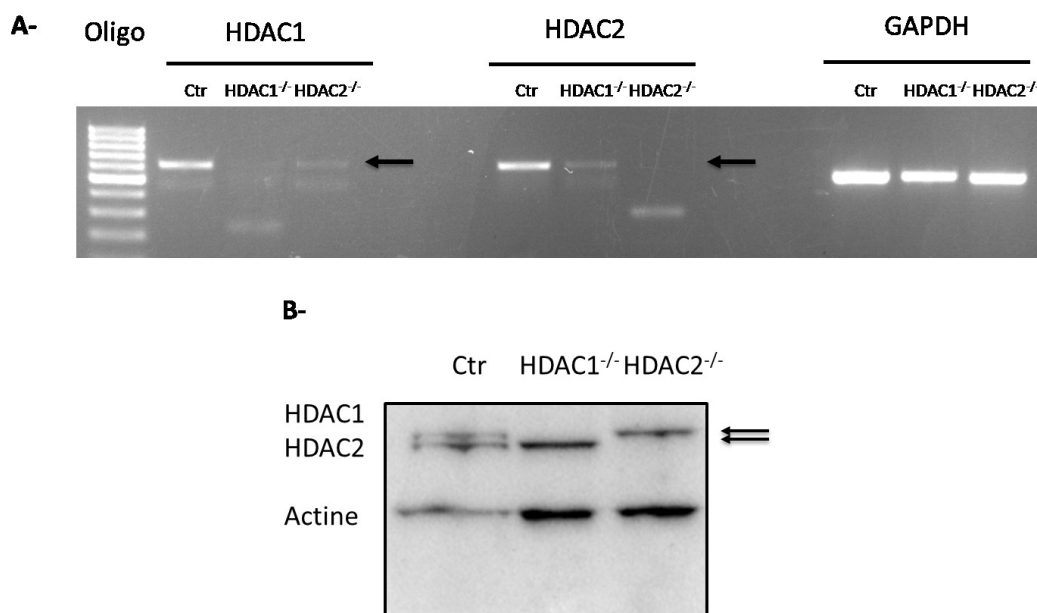


Figure 29 Les niveaux d'ARNm et de protéines de HDAC1 et de HDAC2 sont réduits dans les entéroïdes obtenus de jéjunum de souris Villine-Cre correspondantes. **A.** Les ADNc provenant des ARNm d'entéroïdes contrôle, sans *Hdac1* ou sans *Hdac2* ont été amplifiés par PCR semi-quantitatif, en utilisant GAPDH comme contrôle. Les flèches indiquent les bandes correspondant à HDAC1 ou HDAC2. **B.** Les protéines isolées d'entéroïdes contrôle, sans *Hdac1* ou sans *Hdac2* ont été séparées sur gel SDS-polyacrylamide, transférées sur membrane et révélées avec des anticorps contre HDAC1, HDAC2 et l'actine. Les flèches indiquent les bandes correspondant à HDAC1 ou HDAC2.

Après six passages et trente jours de culture, les entéroïdes ont été récoltés. Les protéines ont été extraites, dosées, réduites, alkylées et digérées à la trypsine avant d'être analysées par spectrométrie de masse (Gonneaud *et al.*, 2016). L'analyse bio-informatique a été réalisée en utilisant le logiciel IPA et sa base de données. Nous avons identifié les voies et les fonctions biologiques principalement modifiées dans les entéroïdes suite à la perte de *Hdac1* ou *Hdac2*, ainsi que les pathologies reliées, de même que les prédictions d'activation ou d'inhibition de certaines voies ou mécanismes biologiques avec le Upstream Regulator Analysis (URA), comme fait précédemment dans le chapitre 2.

Au regard des résultats liés à la perte de *Hdac1* dans les CEI, plusieurs voies canoniques principales telles que les voies métaboliques, notamment celles reliées à la beta-oxydation ou la dégradation de l'éthanol, deux voies permettant la production d'acétyl-CoA, le substrat énergétique et source de groupement acétyl, semblent altérées (Tableau 5). Il est intéressant de constater que des voies associées à la méthylation de l'ADN par exemple sont aussi altérées. D'un point de vue pathologique, les cibles protéiques de HDAC1 recouvrent l'ensemble des maladies gastro-intestinales, métaboliques et inflammatoires (Tableau 5).

| Top Canonical Pathways | |
|--|----------|
| Name | p-value |
| LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function | 2,54E-08 |
| Fatty Acid -oxidation I | 2,65E-06 |
| DNA Methylation and Transcriptional Repression Signaling | 4,12E-06 |
| Ethanol Degradation II | 6,45E-06 |
| Noradrenaline and Adrenaline Degradation | 1,03E-05 |

| Top Upstream Regulators | |
|-------------------------|--------------------|
| Upstream Regulator | p-value of overlap |
| PPARA | 4,31E-24 |
| pirinixic acid | 9,51E-14 |
| CFTR | 1,76E-13 |
| fenofibrate | 2,15E-12 |
| nitrofurantoin | 5,70E-12 |

| Top Diseases and Bio Functions | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Diseases and Disorders | |
| Name | p-value |
| Gastrointestinal Disease | 3,74E-03 - 5,89E-11 |
| Hepatic System Disease | 3,74E-03 - 5,89E-11 |
| Metabolic Disease | 2,57E-03 - 5,89E-11 |
| Organismal Injury and Abnormalities | 3,74E-03 - 5,89E-11 |
| Inflammatory Response | 3,74E-03 - 6,65E-11 |

| Molecular and Cellular Functions | |
|----------------------------------|---------------------|
| Name | p-value |
| Lipid Metabolism | 3,38E-03 - 1,65E-12 |
| Small Molecule Biochemistry | 3,38E-03 - 1,65E-12 |
| Energy Production | 2,93E-03 - 1,03E-11 |
| Protein Synthesis | 3,04E-03 - 2,33E-09 |
| Molecular Transport | 3,38E-03 - 3,29E-09 |

Tableau 5 La perte de *Hdac1* dans les entéroïdes affecte des cibles associées au métabolisme et à des mécanismes épigénétiques. Le tableau représente les principales voies canoniques et les régulateurs identifiés par les bases de données IPA. Les analyses permettent d'apprécier les fonctions biologiques et pathologiques associées à la perte intrinsèque de *Hdac1* dans les entéroïdes (p-value < 0,05).

Parmi les régulateurs prédits pour être activés, et en accord avec l'analyse IPA, nous retrouvons des facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme lipidique et la réponse à des produits de l'environnement, comme PPAR α , PPAR γ ou encore HNF4 α .

L'histone-lysine N-méthyltransférase 2D (KMT2D), une régulatrice majeure de la méthylation sur H3 lysine 4 (H3K4), est prédite pour être activée (Tableau 6).

| Upstream Regulator | Molecule Type | Predicted Activation State | Activation z-score | p-value of overlap |
|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| CFTR | ion channel | Activated | 3,359 | 1,76E-13 |
| HNF4A | transcription regulator | Activated | 3,315 | 3,11E-07 |
| PPARG | ligand-dependent nuclear receptor | Activated | 3,223 | 1,46E-07 |
| bezafibrate | chemical drug | Activated | 2,953 | 4,28E-06 |
| alitretinoïn | chemical drug | Activated | 2,935 | 1,82E-04 |
| pirinixic acid | chemical toxicant | Activated | 2,904 | 9,51E-14 |
| mono-(2-ethylhexyl)phthalate | chemical toxicant | Activated | 2,795 | 1,35E-03 |
| fenofibrate | chemical drug | Activated | 2,78 | 2,15E-12 |
| IL10RA | transmembrane receptor | Activated | 2,704 | 5,56E-05 |
| 5-fluorouracil | chemical drug | Activated | 2,55 | 8,01E-04 |
| CD3 | complex | Activated | 2,496 | 3,93E-03 |
| KMT2D | transcription regulator | Activated | 2,449 | 2,58E-02 |
| palmitic acid | chemical - endogenous mammalian | Activated | 2,407 | 2,58E-02 |
| PPARA | ligand-dependent nuclear receptor | Activated | 2,382 | 4,31E-24 |
| PPARGC1A | transcription regulator | Activated | 2,245 | 2,88E-07 |
| GCG | other | Activated | 2,236 | 2,40E-03 |
| pioglitazone | chemical drug | Activated | 2,169 | 4,86E-03 |
| EGR1 | transcription regulator | Activated | 2,138 | 2,34E-03 |
| INSR | kinase | Activated | 2,041 | 8,27E-04 |
| PPAR α -RXR α | complex | Activated | 2 | 3,33E-05 |
| salirasib | chemical drug | Activated | 2 | 4,54E-03 |
| INSIG1 | other | Activated | 2 | 4,34E-02 |
| memantine | chemical drug | Inhibited | -2 | 1,42E-03 |
| glucagon | biologic drug | Inhibited | -2 | 5,20E-03 |
| desmopressin | biologic drug | Inhibited | -2 | 6,25E-03 |
| cholic acid | chemical - endogenous mammalian | Inhibited | -2 | 1,62E-02 |
| CALCA | other | Inhibited | -2 | 3,15E-02 |
| SCP2 | transporter | Inhibited | -2,065 | 3,48E-06 |
| ERBB2 | kinase | Inhibited | -2,111 | 2,74E-04 |
| rifampin | chemical drug | Inhibited | -2,157 | 3,17E-03 |
| NR0B2 | ligand-dependent nuclear receptor | Inhibited | -2,433 | 1,23E-04 |

Tableau 6 Analyse des régulateurs prédits pour être activés ou réprimés suite à la perte de *Hdac1* dans les entéroïdes. Les résultats de prédictions d'activation des régulateurs sont indiqués en rosé et les résultats de prédictions de répression des régulateurs en bleu (Z-score > 2 et < -2).

Certaines voies similaires à celles affectées en l'absence de *Hdac1* sont aussi retrouvées en absence de *Hdac2*. En effet, des voies associées aux récepteurs hormones stéroïdiennes semblent aussi altérées, mais contrairement aux voies métaboliques sans

Hdac1, l'absence de *Hdac2* affecterait davantage les voies associées aux réponses à l'environnement, comme le récepteur AhR qui transmet les signaux provenant des xénobiotiques et produits bactériens, entre autres (Tian *et al.*, 2015), et le récepteur PXR qui transmet ceux de xénobiotiques et des sels biliaires, entre autres (Qiu *et al.*, 2016). La réponse au stress oxydatif médiée par NRF2 serait également affectée (Nguyen *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que le récepteur AhR présente également des fonctions de régulation du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire. L'analyse IPA a identifié le même type de pathologies associées à l'absence de *Hdac2* qu'à celle de *Hdac1* (Tableau 7).

| Top Canonical Pathways | |
|--|----------|
| Name | p-value |
| LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function | 1,62E-07 |
| Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling | 1,33E-05 |
| Xenobiotic Metabolism Signaling | 1,48E-05 |
| NRF2-mediated Oxidative Stress Response | 1,30E-04 |
| PXR/RXR Activation | 1,46E-04 |

| Top Upstream Regulators | |
|-------------------------|--------------------|
| Upstream Regulator | p-value of overlap |
| CFTR | 5,62E-11 |
| NR1I2 | 2,64E-10 |
| NR1I3 | 5,44E-10 |
| PPARA | 7,77E-09 |
| carbon tetrachloride | 1,16E-08 |

| Top Diseases and Bio Functions | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Diseases and Disorders | |
| Name | p-value |
| Inflammatory Response | 5,94E-03 - 1,86E-08 |
| Cardiovascular Disease | 7,72E-03 - 2,53E-07 |
| Organismal Injury and Abnormalities | 7,72E-03 - 3,37E-07 |
| Metabolic Disease | 7,72E-03 - 2,92E-06 |
| Gastrointestinal Disease | 7,69E-03 - 5,90E-06 |

| Molecular and Cellular Functions | |
|----------------------------------|---------------------|
| Name | p-value |
| Free Radical Scavenging | 7,46E-03 - 1,70E-09 |
| Amino Acid Metabolism | 2,56E-03 - 3,51E-09 |
| Small Molecule Biochemistry | 7,72E-03 - 3,51E-09 |
| Lipid Metabolism | 7,72E-03 - 9,85E-09 |
| Molecular Transport | 7,72E-03 - 9,85E-09 |

Tableau 7 La perte de *Hdac2* dans les entéroïdes affecte des cibles associées à la gestion du stress oxydatif, la réponse aux xénobiotiques et au métabolisme lipidique. Le tableau représente les principales voies canoniques et les régulateurs identifiés par les

bases de données IPA. Les analyses permettent d'apprécier les fonctions biologiques et pathologiques associés à la perte intrinsèque de *Hdac2* dans les entéroïdes (p-value < 0,05).

Les données URA prédisent, comme pour HDAC1, une activation de HNF4 α , couplée cette fois à celle de HNF1 α et PPAR γ . La voie du régulateur NRF2 (NFE2L2) est activée, suggérant une activation de la réponse au stress oxydatif. Cela peut être due à des défauts dans leur production, suite à une hyperactivité mitochondriale, par exemple, ou due à une meilleure gestion de leur niveau. Alors que la voie de HDAC2 est inhibée, celle associée au HDACi VPA est prédite à la hausse. Il faut noter que le VPA est considéré comme un inhibiteur non-spécifique des HDAC de classe I, et qu'il peut altérer d'autres voies de signalisation, notamment celle de Notch (Sun *et al.*, 2015). Il faut aussi noter que l'absence de *Hdac2* pourrait être aussi associée à une inhibition possible d'une voie associée à l'inflammation, comme la voie activée par des composés bactériens, comme le *E. coli* B5 lipopolysaccharide (Tableau 8). Cet effet peut être en relation ou le résultat de l'activation de la voie canonique du récepteur Ah (Tableau 8).

| Upstream Regulator | Molecule Type | Predicted Activation State | Activation z-score | p-value of overlap |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| HNF4A | transcription regulator | Activated | 2,713 | 6,58E-05 |
| IL10RA | transmembrane receptor | Activated | 2,688 | 1,95E-07 |
| alitretinoïn | chemical drug | Activated | 2,587 | 2,35E-04 |
| PPARG | ligand-dependent nuclear receptor | Activated | 2,564 | 3,71E-03 |
| bezafibrate | chemical drug | Activated | 2,408 | 1,18E-04 |
| fenofibrate | chemical drug | Activated | 2,291 | 8,96E-07 |
| NFE2L2 | transcription regulator | Activated | 2,29 | 4,74E-06 |
| valproic acid | chemical drug | Activated | 2,2 | 2,80E-01 |
| HNF1A | transcription regulator | Activated | 2,19 | 6,15E-02 |
| CFTR | ion channel | Activated | 2,164 | 5,62E-11 |
| arsenic trioxide | chemical drug | Activated | 2,075 | 1,04E-04 |
| ACOX1 | enzyme | Inhibited | -2 | 2,80E-02 |
| HDAC2 | transcription regulator | Inhibited | -2 | 2,02E-02 |
| eflornithine | chemical drug | Inhibited | -2 | 2,81E-04 |
| progesterone | chemical - endogenous mammalian | Inhibited | -2,043 | 7,56E-03 |
| E. coli B5 lipopolysaccharide | chemical - endogenous non-mammalian | Inhibited | -2,19 | 1,12E-03 |
| TGFB1 | growth factor | Inhibited | -2,191 | 1,36E-04 |
| ALDH2 | enzyme | Inhibited | -2,219 | 8,93E-07 |
| cycloheximide | chemical reagent | Inhibited | -2,228 | 2,59E-03 |
| TGM2 | enzyme | Inhibited | -2,236 | 3,46E-02 |
| decitabine | chemical drug | Inhibited | -2,289 | 1,39E-04 |
| ESR1 | ligand-dependent nuclear receptor | Inhibited | -2,331 | 3,17E-03 |

Tableau 8 Analyse des régulateurs prédits pour être activés ou réprimés suite à la perte de *Hdac2* dans les entéroïdes. En rouge, les résultats de prédictions d'activation et en bleu de répression des régulateurs (Z-score > 2 et < -2).

L'ensemble de ces analyses nous suggèrent des fonctions communes et spécifiques reliées à la perte de *Hdac1* ou de *Hdac2* dans les entéroïdes et d'ainsi étudier leurs effets dans les CEI de manière environnement indépendante. Comme pour les résultats observés dans le chapitre 2, une validation fonctionnelle dans les voies prédites pour varier sera nécessaire. Bien que des voies associées aux récepteurs aux hormones stéroïdiennes semblent affectées en l'absence de l'un ou l'autre *Hdac*, il est intéressant de noter que l'absence de *Hdac1* semble altérer davantage des voies régularisant le métabolisme, comme la beta-oxydation et la dégradation de l'éthanol, alors que l'absence de *Hdac2* touche davantage des voies associées à la réponse à l'environnement. De plus, l'absence de *Hdac2* semble modifier des voies reliées au stress oxydatif et à la réponse inflammatoire aux produits bactériens. Certaines voies métaboliques sont retrouvées communément affectées par ces pertes, ces effets peuvent être envisagés comme une adaptation des entéroïdes afin de mieux supporter une demande accrue en groupement acétyl lié à la perte d'une de ces *Hdac*. Il est important de noter que ces voies ne seraient pas les mêmes, HDAC1 affecterait plus le catabolisme alors que HDAC2 affecterait plus le stress oxydatif (peut être due à des perturbations dans les voies de synthèse énergétiques) et la signalisation par le récepteur Ah. La délétion de *Hdac2* suggère une implication accrue dans les mécanismes de défense de la CEI. Il serait dès lors intéressant d'étudier la réponse à des stress inflammatoires type microbien dans ces entéroïdes. Cela permettrait de déterminer si la perte intrinsèque de *Hdac1* ou de *Hdac2* dans les CEI pourrait améliorer ou au contraire amplifier les effets de l'inflammation.

6. Discussion

6.1. HDAC1 et HDAC2 CEI-spécifiques ont des rôles similaires et distincts dans le contrôle de l'homéostasie intestinale

Grâce au modèle murin Villine-Cre qui permet une délétion CEI-spécifique durant l'embryogénèse, nous avons étudié l'effet de la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* uniquement dans les CEI. Les études sur les souris ont porté à la fois sur l'intestin proximal et sur le côlon, notamment pour l'étude lors d'une colite chimique induite par le DSS. Pour les approches -omics et les entéroïdes, nous avons utilisé les CEI provenant du jéjunum. Dans les études précédentes, nous avons observé que la double perte de *Hdac1* et de *Hdac2* dans les CEI entraîne des altérations de la fonction barrière physique et chimique, une hyperplasie, la perte de cellules de Paneth et de cellules à mucus et l'augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires dans la muqueuse, indicatif du recrutement de cellules immunitaires (Turgeon *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que les souris sans *Hdac2* ou *Hdac1* dans les CEI ne présentent pas de désorganisation apparente de l'architecture des tissus, d'hyperplasie ou encore de défauts de différenciation (Turgeon *et al.*, 2014).

L'augmentation de l'expression de gènes inflammatoires dans la muqueuse de souris Villine-Cre *Hdac1^{-/-};Hdac2^{-/-}* est en partie causée par la fonction barrière altérée menant à une interaction accrue de la muqueuse avec le microbiote intestinal. Ceci mène à un nouvel équilibre homéostatique, créant un milieu inflammatoire chronique, comme le montrent les analyses de micropuce de la muqueuse intestinale au complet. Les souris mutantes vivent plus d'un an sans décès ou autres complications.

La perte des cellules de Paneth et la diminution des cellules à mucus déstabilisent la fonction protection de la barrière. Néanmoins, une augmentation des peptides antimicrobiens comme REG3 γ est observée, suggérant la mise en place d'un nouveau mécanisme de défense qui sépare le microbiote de la surface intestinale de la muqueuse (Vaishnava *et al.*, 2011). En effet, REG3 γ affiche des activités bactéricides sélectives pour les bactéries Gram-positives (Cash *et al.*, 2006) et est, de plus, induit dans les maladies

inflammatoires intestinales (MII) (Keilbaugh *et al.*, 2005, van Beelen Granlund *et al.*, 2013). Ce nouvel équilibre pourrait donc être atteint via une adaptation du dialogue entre le microbiome, l'épithélium et le système immunitaire sous-jacent. En effet, il est reconnu que les interactions entre la microflore et les CEI, notamment via les PRR (NLR et TLR) (Maynard *et al.*, 2012), peuvent instaurer des mécanismes de régénération de l'épithélium (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004), et également instruire le système immunitaire (Skoczek *et al.*, 2014). Cela pourrait corrélérer avec un recrutement de différentes cellules immunes qui à leur tour vont sécréter des cytokines et immunoglobulines, entre autres, pour contrôler le microbiote. Ceci pourrait également envoyer des signaux à la niche épithéliale pour favoriser sa régénération, en induisant de multiples voies comme les voies IL6/IL22-STAT3 (Lindemans *et al.*, 2015). Cette voie peut agir à la fois sur la prolifération et sur la réponse inflammatoire (Lin *et al.*, 2011, Karin et Clevers, 2016).

Néanmoins, des différences sont observées lors d'un traitement au DSS, où les dommages sont aggravés chez le double mutant, alors que la perte de *Hdac2* diminue les symptômes liés à la colite. Les données de micropuce sur la muqueuse colonique totale indiquent que la perte de *Hdac2* conduit à une expression basale dérégulée d'un sous-ensemble de gènes inflammatoires, soit à la baisse ou à la hausse, tels que REG3 γ . Il est à noter que les souris mutées pour *Hdac2* affichent une expression accrue de gènes spécifiques de la plupart des CEI comme REG3 β , REG3 γ , des protéines de transport lipidique, APOA1 ou APOA4, alors que les gènes liés à la fonction des cellules immunitaires sont régularisés à la baisse, comme CD3 ou le facteur du complément D, suggérant une réduction du recrutement de cellules immunes. Au contraire, les souris mutées pour *Hdac1* et traitées au DSS ne présentent pas de modifications apparentes dans les symptômes de la colite et sont aussi sensibles que les souris contrôle (Gonneaud *et al.*, 2015).

Donc, l'absence de *Hdac1* et *Hdac2* entraîne la production d'une inflammation chronique, par le recrutement de cellules immunitaires, entre autres. Ces études ne nous ont néanmoins pas permis de déterminer directement l'état inflammatoire ou non, des CEI sans *Hdac1* et *Hdac2* (voir plus loin). Ces données mettent aussi en évidence des fonctions

partagées et spécifiques pour HDAC1 et HDAC2, et suggèrent que différents niveaux d'expression de HDAC1 et HDAC2 pouvaient entraîner différents phénotypes. Ces aspects nous ont donc poussés à déterminer à quel point des variations dans les niveaux de HDAC1 ou HDAC2 maintiennent une homéostasie intestinale et à vérifier le phénotype de souris sans *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI chez l'adulte. Nous avons d'abord généré des souris hétérozygotes délétées pour *Hdac1* avec un allèle de *Hdac2* et des souris délétées pour *Hdac2* avec un allèle de *Hdac1* (Chapitre 1,(Gonneaud *et al.*, 2015)).

Nous avons montré que différents niveaux d'expression des HDAC sont associés à divers changements phénotypiques dans le modèle de la souris Villine-Cre, et que HDAC2 est un régulateur crucial de l'homéostasie intestinale. En effet, les souris avec un allèle de *Hdac2* sans *Hdac1* présentent des phénotypes intermédiaires par rapport aux souris doubles mutantes. De plus, les deux modèles *Hdac1*^{-/-}; *Hdac2*^{-/-} et *Hdac1*^{-/-}; *Hdac2*^{+/-} dans les CEI partagent des défauts phénotypiques, notamment une prolifération accrue, une réduction du nombre de cellules à mucus, une perte de polarité et d'architecture tissulaire, une expression accrue de marqueurs entérocytaires, une augmentation du recrutement de cellules immunitaires et de la fibrose du tissu colique, ainsi qu'une sensibilité accrue à la colite induite par le DSS. Cependant, une différence importante par rapport aux souris doubles mutantes concerne la migration, qui n'est pas augmentée. La perméabilité intestinale, suite au traitement au DSS, montre une tendance à la hausse, mais non significative, et le nombre de cellules de Paneth n'est pas modifié de manière significative chez les souris avec un allèle de *Hdac2* par opposition aux souris doubles mutantes.

De plus, une activation intermédiaire des voies Notch, mTOR et STAT3 est observée chez la souris hétérozygote *Hdac2* en l'absence de *Hdac1*, comparativement aux souris doubles mutantes. En revanche, la présence d'un allèle de *Hdac1*, en l'absence de *Hdac2*, est suffisante pour maintenir apparemment l'homéostasie intestinale, sans suractivation des voies Notch, mTOR et STAT3. Cependant, quelques variations sont observées, comme l'expression du marqueur de l'intestin grêle, la sucrose-isomaltase, dans le côlon, une diminution à des niveaux intermédiaires de la claudine 3, et une sensibilité accrue à la colite induite par le DSS, malgré une perméabilité comparable à celle des souris

contrôle en présence du DSS. Les deux hétérozygotes donnent donc le même phénotype face à un traitement au DSS (DAI augmenté dans les deux par rapport au contrôle) avec pas ou peu d'effets sur la perméabilité, possiblement dû à une expression restante de certains gènes dans les CEI des hétérozygotes (similaires entre les 2) qui peuvent contrôler positivement la perméabilité. Cependant, l'expression d'autres gènes n'est pas suffisante pour contrôler la colite.

De manière intéressante, l'équipe d'Artis a montré que la délétion dans les CEI d'un autre membre de la classe I des HDAC, à savoir *Hdac3*, entraîne une perturbation de la fonction barrière, une diminution du nombre de cellules de Paneth et une augmentation de la prolifération dans les cryptes. Alors que cette délétion n'entraîne pas d'anomalies apparentes de l'architecture du tissu ou de la cellule, des changements dans la composition de microbiote et une sensibilité accrue à la colite chimique induite par le DSS sont néanmoins retrouvés. Ces données suggèrent donc que les HDAC de classe I pourraient partager des fonctions similaires dans le maintien de l'homéostasie intestinale normale et en conditions de stress, tels que lors d'une colite (Alenghat *et al.*, 2013).

Dans nos modèles de souris, il est intéressant de noter que certains niveaux d'expression de HDAC1 ou de HDAC2 permettent d'assurer un développement normal de l'épithélium intestinal. Comme le nombre de cellules de Paneth ne semble pas significativement affecté dans les deux modèles hétérozygotes, ceci suggère que la niche épithéliale reste stable. En effet, les cellules de Paneth contribuent au maintien et au développement de la crypte. Ces cellules expriment de l'EGF, le TGF α , le WNT3 ou encore le ligand Notch DLL4, des signaux essentiels pour le maintien des cellules souches Lgr5⁺ de la crypte intestinale (Sato *et al.*, 2011). Il est à noter que le double mutant a peu de cellules de Paneth mais maintient la prolifération dans la crypte, suggérant une implication de l'environnement. Nous reviendrons plus loin là-dessus. Nos données suggèrent que la fonction barrière et immunitaire de la muqueuse dépendent fortement des niveaux d'activité de HDAC2. Les changements opérés chez l'hétérozygote HDAC2, comme une augmentation de la prolifération des CEI associée à une diminution du nombre de cellules à mucus, corrèle avec une augmentation de Notch clivé, l'activation de la voie

mTOR et celle de STAT3. Ces modifications peuvent influencer les cellules de la TA à se différencier en faveur des entérocytes. Des données récentes ont montré un lien entre l'activation des voies mTOR, Notch et STAT3. En effet, l'activation de mTOR entraîne celle de Notch dans des cellules de carcinome du côlon (Zhou *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2015), et l'activation de Notch et STAT3 dans d'autres types de cellules (Ma *et al.*, 2010). Il est à noter que l'activation de STAT3 (Neufert *et al.*, 2010) et Notch (Sancho *et al.*, 2015) sont importantes pour la régénération des CEI en cas de lésion ou d'inflammation (Karin et Clevers, 2016). Les mécanismes activant ces voies sont généralement inter-reliés et souvent impliqués dans les MII. Une activité élevée de mTOR a été observée dans les CEI de patients atteints de MII (Deng *et al.*, 2010) et des inhibiteurs de TORC1, comme le Sirolimus, se sont révélés efficaces pour diminuer les symptômes de colite chez la souris (Yin *et al.*, 2013).

De plus, certaines protéines impliquées dans les voies de Notch, STAT3 et mTOR, tels que Notch et STAT3 elles-mêmes, et les S6 kinases, peuvent être acétylées, ce qui entraîne une régulation de la stabilité et/ou de l'activité des protéines (Lee *et al.*, 2009, Fenton *et al.*, 2010, Guarani *et al.*, 2011). Il serait dès lors intéressant de déterminer si l'activation de ces voies est due à l'acétylation directe des cibles protéiques et à leur contrôle par HDAC1 et/ou HDAC2 et de comprendre l'acétylome dépendant de HDAC1 et HDAC2. L'acétylome, qui est l'ensemble complet des acétylations de protéines, est contrôlé par l'activité HDAC et aussi par l'environnement, comprenant le métabolisme cellulaire, l'alimentation et les produits bactériens. En effet, le métabolisme induit des variations dans les niveaux nucléaires d'acétyl-CoA modifiant l'acétylation des histones (Wellen *et al.*, 2009, Patel *et al.*, 2011). En outre, les niveaux d'acétylation sont régularisés par des HDACi endogènes, tels que le sphingosine phosphate (Hait *et al.*, 2009), le β -hydroxybutyrate (Shimazu *et al.*, 2013) et la carnitine (Huang *et al.*, 2012), dont les niveaux varient selon le métabolisme cellulaire. Les produits diététiques dérivés du régime alimentaire ou modifiés par voie bactérienne modulent l'activité des HDAC et le patron d'acétylation (Ho et Dashwood, 2010). Le microbiote est essentiel pour établir l'acétylome, comme le montrent les protéines acétylées augmentées dans le foie et l'intestin de souris sans germe réimplantées avec des microbes intestinaux (Simon *et al.*, 2012). Les HDACi

pharmacologiques, qui augmentent l'acétylation des protéines, sont anti-inflammatoires dans des modèles murins de colite (Edwards et Pender, 2011).

6.2. L'environnement de la muqueuse semble important dans le maintien des CEI sans *Hdac1* et *Hdac2*

Les modèles murins Villine-Cre induisent des délétions de *Hdac1* et/ou *Hdac2* dès le 15^e jour de développement embryonnaire. Ceci laisse du temps pour établir des mécanismes de compensation et l'établissement d'un nouvel équilibre homéostatique, permettant peut-être la survie des souris sans *Hdac1* et *Hdac2* dans l'épithélium. Nous avons aussi remarqué que la délétion n'est pas complète, et que certaines cellules conservent HDAC1 ou HDAC2, même si la plupart n'ont ni l'un ni l'autre. Néanmoins, nous avons voulu vérifier la conséquence de l'ablation de HDAC1 et HDAC2 dans les souris adultes. Nous avons utilisé deux modèles de délétion inductibles pour étudier l'effet de la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* chez des souris adultes, soit le modèle Ah-Cre, qui induit le récepteur AhR retrouvé sur les CEI et les cellules immunitaires entre autres, et inductible par le naphthoflavone (Ireland *et al.*, 2004), et les souris Villine-Cre^{ER}, qui assure l'expression d'une recombinaison Cre fusionnée à une portion du récepteur des œstrogènes inductible par le Tamoxifène (el Marjou *et al.*, 2004).

D'abord, l'induction de la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* dans les souris Ah-Cre a entraîné après 6 jours de traitement la mort des souris, associée non seulement à des défauts sévères au niveau de l'intestin, notamment un épithélium érodé, des zones cryptales éliminées, une prolifération réduite et une diminution du nombre de cellules de Paneth et de cellules à mucus, mais aussi à des défauts de prolifération et de différenciation au niveau de l'estomac. En plus de la perte de prolifération, les dommages à l'ADN résultant de la présence de ruptures d'ADN double brin sont augmentés, tels que démontré par la présence de zones comprenant γ -H2AX phosphorylé, un marqueur de ce type de dommages (Redon *et al.*, 2012). Des dommages à l'ADN ont également été observés *in vivo* dans des cellules neurales avec la double délétion de *Hdac1* et de *Hdac2* (Hagelkruys *et al.*, 2014). Il a également été montré que la perte de *Hdac1* et de *Hdac2* affecte la croissance de cellules tumorales en culture, en déstabilisant la ségrégation des

chromosomes, créant des catastrophes mitotiques (Jamaladdin *et al.*, 2014). Ainsi, la délétion induite de *Hdac1* et *Hdac2* chez l'adulte révèle leur importance dans la régulation de la réplication de l'ADN et de la réparation de l'ADN (Miller *et al.*, 2010, Bhaskara *et al.*, 2013, Bhaskara, 2015). Récemment, Zimberlin *et al.* (2015) ont démontré un phénotype similaire en supprimant à la fois *Hdac1* et *Hdac2* dans l'épithélium intestinal dans le même modèle Ah-Cre. Alors que la réponse aux dommages causés par l'ADN n'a pas été étudiée, les auteurs ont observé que la délétion inductible de *Hdac1* et *Hdac2* entraîne une altération du développement de l'épithélium *in vivo* et en culture d'entéroïdes de CEI provenant du jéjunum, comme en témoigne une diminution d'expression des marqueurs de cellules souches. Ainsi, en plus des fonctions de régulation dans la réparation de l'ADN des CEI, HDAC1 et HDAC2 peuvent jouer un rôle essentiel dans la définition du caractère souche des CEI (Zimberlin *et al.*, 2015).

A la lumière de ces résultats, nous pourrions donc supposer que la perte de *Hdac1* et *Hdac2* à l'âge adulte est létale parce qu'il n'y a pas de mécanismes de compensation qui se sont établis pour assurer la survie des CEI sans *Hdac1* et *Hdac2*. Une signalisation régénératrice, comme observée dans le double mutant embryonnaire, n'a pas le temps de se former. Ce même effet a été observé dans des fibroblastes de souris dans lesquels *Hdac1* et *Hdac2* ont été délétés de manière inductible (Yamaguchi *et al.*, 2010).

De façon surprenante, la suppression de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI dans le modèle Villine-Cre^{ER} chez la souris adulte donne des résultats différents. En effet, la délétion entraîne, après 6 jours de traitement, des défauts d'architecture tissulaire associés à des cryptes élargies, avec une diminution du nombre de cellules à mucus, sans effet sur la prolifération et le nombre de cellules de Paneth. Comme observé dans le modèle Villine-Cre, la délétion n'est pas complète, avec une expression hétérogène, principalement de HDAC2, alors que l'inactivation de *Hdac1* est presque complète. Zimberlin *et al.* (2015) ont montré que la suppression par Ah-Cre d'un allèle de *Hdac2* et des deux allèles de *Hdac1* entraîne des défauts de différenciation et d'architecture intestinale ressemblant étroitement à ceux obtenus dans nos modèles doubles mutants *Hdac1* et *Hdac2* Villine-Cre^{ER} et Villine-Cre. Ainsi, alors que la suppression médiée par Ah-Cre de *Hdac1* et

Hdac2 entraîne un arrêt de croissance (notre étude, (Zimberlin *et al.*, 2015)), la suppression médiée par Villine-Cre^{ER} conduit à un phénotype similaire, sans augmentation de prolifération significative, à celui des souris Villine-Cre *Hdac1*^{-/-}; *Hdac2*^{-/-} et *Hdac1*^{-/-}; *Hdac2*^{+/-}, ainsi que les souris Ah-Cre *Hdac1*^{-/-}; *Hdac2*^{+/-} (Zimberlin *et al.*, 2015). Comment peut-on expliquer la différence de phénotype que nous observons entre les deux mutants inductibles Ah-Cre et Villine-Cre^{ER}? La possibilité la plus simple est que le modèle Ah-Cre assure une délétion complète de *Hdac1* et *Hdac2* alors que le modèle Villine-Cre^{ER} mène à une délétion incomplète, qui peut assurer une certaine compensation. Or, grâce à la culture d'entéroïdes, qui à partir des cryptes prolifératives avec des cellules souches flanquées par des cellules de Paneth, assurent l'accroissement et le développement de structures épithéliales comprenant tous les types cellulaires formant l'épithélium intestinal (Sato *et al.*, 2009), nos résultats en excluent cette possibilité. En effet, nous avons été incapables de mettre en culture des entéroïdes provenant de cryptes de souris Villine-Cre *Hdac1*^{-/-}; *Hdac2*^{-/-}. De plus, l'induction de la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* dans des entéroïdes en culture par le Tamoxifène mène à l'arrêt de prolifération de ces entéroïdes. Ces résultats suggèrent que l'environnement de la muqueuse pourrait bel et bien maintenir la croissance de CEI dépourvues de *Hdac1* et *Hdac2* dans le modèle Villine-Cre^{ER} mais pas dans le modèle Ah-Cre. Dans ce dernier modèle, il est fort possible que l'environnement soit modifié différemment que dans l'autre.

Qu'est-ce qui pourrait soutenir les CEI sans *Hdac1* et *Hdac2* *in vivo*? Une première possibilité viendrait de l'interaction entre les CEI et le milieu inflammatoire de la muqueuse. Il a été proposé que l'inflammation affecte la prolifération des cellules souches intestinales et la régénération après un dommage (Kizil *et al.*, 2015). Chez les souris Villine-Cre et Villine-Cre^{ER}, la délétion incomplète ainsi que le milieu inflammatoire favoriseraient la prolifération des CEI partiellement ou même complètement recombinaisons, et conduiraient ainsi à l'expansion des populations de cellules mixtes. Une cytokine pro-inflammatoire comme l'IL-22 pourrait être en partie responsable. En effet, IL-22 est produite par des lymphocytes NK et T, et des cellules lymphoïdes innées (Taube *et al.*, 2011), activés en réponse à des agents pathogènes bactériens, et active la signalisation de JAK/STAT dans les cellules souches intestinales pour stimuler leur prolifération et leur

régénération (Jiang *et al.*, 2009). A noter, que la régénération intestinale médiée par l'IL-22 peut aussi se produire en l'absence de cellules de Paneth, suggérant qu'elle puisse agir en ciblant directement les cellules souches (Lindemans *et al.*, 2015). Une deuxième possibilité proviendrait des cellules de Paneth restantes ou du mésenchyme, qui apporteraient le WNT nécessaire au maintien de la niche épithéliale. Ce phénomène pourrait être absent du modèle Ah-Cre, notamment dû à la perte de la zone cryptale et d'un recrutement trop massif de cellules immunitaires. Les ligands WNT sécrétés par des cellules mésenchymateuses sous-épithéliales sont essentiels à la survie des cellules souches intestinales et de l'homéostasie intestinale (Valenta *et al.*, 2016). Une troisième possibilité serait une supplémentation en métabolite lactate et/ou pyruvate fournie par les cellules de Paneth aux cellules souches pour supporter leur activité accrue d'oxydo-réduction. En effet, il a été démontré que les cellules souches Lgr5⁺ et les cellules de Paneth fraîchement isolées de l'intestin grêle de la souris affichent différents programmes métaboliques. Par rapport aux cellules de Paneth, les cellules souches Lgr5⁺ affichent une forte activité mitochondriale. L'inhibition de l'activité mitochondriale dans les cellules souches ou l'inhibition de la glycolyse dans les cellules de Paneth perturbe fortement la fonction des cellules souches, les entéroïdes ne se développant plus. Les cellules de Paneth via la glycolyse fournissent du lactate aux cellules souches afin de soutenir leur activité mitochondriale. La formation d'entéroïdes à partir d'une seule cellule souche Lgr5⁺ est facilitée par l'ajout de lactate dans le milieu (Rodriguez-Colman *et al.*, 2017). Il serait possible qu'en l'absence de cellules de Paneth, d'autres cellules recrutées dans la muqueuse inflammée chez les souris mutantes pourraient pallier ces besoins en métabolites. La mise en culture des entéroïdes sans *Hdac1* et *Hdac2* est probablement limitée par le fait que les cellules de Paneth, qui supportent les cellules souches en apportant des facteurs WNT (Farin *et al.*, 2012), sont quasiment absentes dans ce modèle murin, comme démontré par microscopie électronique et immunofluorescence. Les cellules souches en culture se retrouvent donc privées du soutien apporté par l'environnement *in vivo*, qui compense l'absence de cellules de Paneth, et donc la croissance n'est pas soutenue. Ce phénotype a été observé dans des souris inductibles (Villine-Cre^{ER}) de délétion pour ATOH1 dans les CEI. *In vivo*, la délétion n'a pas d'impact sur les cellules souches mais lors de la mise en culture en entéroïdes, une dégénérescence survient après

trois jours de culture. Les auteurs notent une potentielle récupération pour quelques entéroïdes suite à l'ajout de WNT3 (Durand *et al.*, 2012). Il est connu que WNT3 augmente la prolifération des entéroïdes et favorise un statut plus prolifératif que différencié (Sato *et al.*, 2011). Plusieurs autres composants de l'environnement de la muqueuse pourraient aussi maintenir les CEI sans *Hdac1* et *Hdac2* et assurer une compensation *in vivo*. Comme observé avec le modèle murin, nous pourrions stimuler la prolifération via les cytokines IL-6 et IL-22, qui activeraient la régénération des cellules souches par le sentier STAT3 (Grivennikov *et al.*, 2009). Nous pourrions aussi tester toutes ces approches seules ou en combinaison afin d'évaluer la capacité de récupération des entéroïdes sans *Hdac1* et *Hdac2*.

Maintenant, comment pourrait-on expliquer l'effet drastique de la délétion de *Hdac1* et *Hdac2* dans les souris Ah-Cre ? Nous supposons que, dans les souris mutantes Ah-Cre, l'activation du récepteur Ah pourrait modifier les signaux inflammatoires et rendre l'environnement muqueux moins favorable à l'expansion des CEI. En effet, le facteur de transcription AhR est activé par de nombreux ligands, notamment les xénobiotiques ainsi qu'un certain nombre de ligands dérivés du tryptophane dans le régime alimentaire (Hao et Whitelaw, 2013, Fallarino *et al.*, 2014). AhR est considéré comme un régulateur négatif de l'inflammation intestinale (Monteleone *et al.*, 2013). L'activation d'AhR est nécessaire pour le maintien et l'expansion des lymphocytes intra-épithéliaux et des cellules lymphoïdes innées. De plus, la suppression d'AhR chez la souris conduit à une augmentation des symptômes de colite induite par le DSS (Furumatsu *et al.*, 2011). Il est donc possible que le naphthoflavone affecte non seulement les CEI, assurant la délétion de *Hdac1* et *Hdac2*, mais aussi plusieurs types de cellules immunitaires innées ou adaptatives, au niveau de leur potentiel inflammatoire, qui peut avoir autant des effets positifs ou négatifs, selon les circonstances. La modification dans les signaux inflammatoires induite par l'activation d'AhR pourrait en partie rendre l'environnement de la muqueuse moins favorable au maintien de la niche épithéliale. Il est également important de retenir que la délétion induite dans le modèle Ah-Cre n'est pas cantonnée à l'intestin, mais aussi à l'estomac, au foie et au pancréas. Dans l'estomac, nous avons observé que l'induction de la délétion affecte aussi les cellules de l'antra, avec un nombre réduit de cellules à mucus, un nombre accru de

cellules pariétales et une diminution du nombre de cellules prolifératives. Au niveau du foie (que nous n'avons pas étudié), il a été démontré que la perte de *Hdac1* entraînait un arrêt de prolifération après une hépatectomie partielle (Wang *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que, dans le foie des souris, l'expression de la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK) et du facteur nucléaire 4 (HNF4 α) de l'hépatocyte est significativement diminuée suite à un traitement avec un inhibiteur de HDAC de classe I (Oiso *et al.*, 2011). L'homéostasie hépatique peut donc aussi être fortement affectée par la perte de *Hdac1* et de *Hdac2*. Une autre étude rapporte que le VPA, un inhibiteur de HDAC de classe I, retarde la régénération hépatique et interrompt le cycle cellulaire des cellules hépatiques, provoquant ainsi un effet anti-prolifératif sur la régénération (Ke *et al.*, 2012). Ces points pourraient contribuer au phénotype observé dans notre modèle Ah-Cre.

Il est reconnu que des HDACi affectent le développement et la prolifération dans de multiples modèles de culture et même *in vivo*, comme nous l'avons vu précédemment (Beckers *et al.*, 2007). Nous avons alors évalué l'effet du HDACi CI994 sur le développement des entéroïdes (Chapitre 3; (Gonneaud *et al.*, 2016)). Morphologiquement, les entéroïdes traités avec le CI994 sont plus petits, avec une diminution du nombre de cryptes, indiquant une réduction des mécanismes contrôlant le renouvellement et la différenciation des CEI. La différenciation altérée en faveur des entérocytes est observée dans les entéroïdes traités avec le CI994, tel que suggéré par l'augmentation de l'expression des gènes encodant les protéines antimicrobiennes REG3 β et REG3 γ , et la diminution de l'expression de marqueurs de cellules sécrétrices, notamment MUC2, un marqueur de cellules à mucus, ainsi que CHGB et GIP, des marqueurs de cellules entéroendocrines. Ces changements d'expression sont similaires à ceux observés chez les souris doubles mutantes *Hdac1*^{-/-};*Hdac2*^{-/-} Villine-Cre (Turgeon *et al.*, 2014). Cela suggère que les HDACi peuvent mimer dans une certaine mesure les délétions génétiques. Ce ralentissement de croissance des entéroïdes soulève aussi l'importance de l'environnement dans le maintien de la prolifération de la niche épithéliale *in vivo* en l'absence de *Hdac1* et *Hdac2*. En effet, le HDACi inhibe la prolifération des entéroïdes, phénomène aussi retrouvé dans nos essais de mise en culture d'entéroïdes sans *Hdac1* et *Hdac2*. Donc, des changements génétiques peuvent dans une certaine mesure être reproduits par un agent

pharmacologique. Nous avons également pu observer que, contrairement à l'arrêt de croissance des entéroïdes sans *Hdac1* et *Hdac2* et le retard de développement de ceux traités au CI994, l'absence de *Hdac1* ou de *Hdac2* dans les entéroïdes n'entraîne pas de modifications phénotypiques notables, confirmant la possibilité d'une compensation de la perte de l'un par rapport à l'autre, comme observé dans les modèles *in vivo* (Turgeon *et al.*, 2014).

Nous avons ainsi montré que l'homéostasie intestinale est extrêmement sensible aux variations d'expression des gènes encodant *Hdac1* et *Hdac2*, que HDAC1 et HDAC2 ont des effets spécifiques et redondants sur les CEI, entraînant des modifications de l'environnement et de la réponse intestinale aux stress inflammatoires. Nous devons par la suite étudier les mécanismes compensatoires mis en place dans la muqueuse, permettant la survie des CEI sans *Hdac1* et *Hdac2*.

6.3. HDAC1 et HDAC2 ont des cibles similaires et complémentaires intrinsèques aux CEI

Dans le but de déterminer l'impact moléculaire intrinsèque aux CEI causé par la perte de *Hdac1* et *Hdac2*, nous avons mesuré l'expression globale des ARNm, soit le transcriptome, par ARN-Seq, et celle des protéines, soit le protéome, par protéomique quantitative de type TMT, dans les CEI enrichies à partir du jéjunum de souris contrôle et mutantes (Chapitre 2). De même, nous avons développé des modèles d'entéroïdes sans *Hdac1* ou sans *Hdac2*, ou traités avec un HDACi, le CI994 (Chapitre 3 et 4). Notre stratégie a été d'utiliser le potentiel de développement de ces entéroïdes pour l'appliquer à une approche protéomique quantitative de type SILAC. La protéomique quantitative permet de mesurer des changements du protéome lors de la différenciation cellulaire, ou en réponse à différents inhibiteurs et médicaments. De plus, avec la récente adaptation de la technologie des entéroïdes à la médecine de précision (Huang *et al.*, 2015), la combinaison de la culture en entéroïdes avec la protéomique quantitative devient une stratégie de choix pour quantifier les changements globaux dans l'expression des protéines, identifiant ainsi de nouvelles voies de signalisation et des cibles potentielles dans des contextes environnementaux définis.

Nos études -omics chez la souris suggèrent des changements profonds dans plusieurs voies de signalisation associées autant à la prolifération et au métabolisme qu'aux réponses au stress et à l'environnement. L'analyse protéomique à partir des CEI de jéjunum a permis d'identifier un certain nombre de protéines induites de façon indépendante de la transcription, donc par des mécanismes de régulation post-traductionnelle, suggérant ainsi l'importance de certaines voies induites, comme celle de mTOR, un régulateur majeur des processus traductionnels (Wang et Proud, 2006). Plusieurs fonctions sont prédites augmentées, en accord avec le phénotype observé *in vivo* (Turgeon *et al.*, 2013), comme la prolifération cellulaire, la migration des cellules dans l'ARN-Seq et le cancer du système digestif (dû à l'hyperprolifération dans ce modèle) et l'inflammation des organes dans le protéome TMT. A l'opposé, la signalisation du stress oxydatif médié par NRF2 serait communément diminuée, de même que certains processus lipidiques comme leur conversion. En effet, un aspect important de nos études est de révéler d'importants changements dans les processus métaboliques causés par les délétions de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI. Ceci est en accord avec la littérature où des dérégulations métaboliques ont été observées dans plusieurs modèles d'inhibition ou de délétion de *Hdac*. En effet, l'utilisation de HDACi de classe I, comme le MS-275, ou d'un pan-HDACi, comme le SAHA, entraîne une augmentation du nombre de mitochondries et du métabolisme oxydatif dans le muscle squelettique et le tissu adipeux chez la souris (Galmozzi *et al.*, 2013). Nos résultats proposent que la perte de *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI *in vivo* perturbe, entre autres, les voies de synthèse et d'utilisation des lipides en agissant possiblement sur les PPAR, comme PPAR α . Les PPAR sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires. Les PPAR agissent comme senseurs lipidiques. PPAR α régularise notamment des gènes comme les transporteurs lipidiques APO et des régulateurs importants de la β -oxydation, comme l'acyl-CoA oxydase (Contreras *et al.*, 2013). Il est intéressant de constater que l'analyse de l'expression globale de gènes suite à une délétion de *Hdac3* dans les CEI du côlon, montre un enrichissement dans des voies impliquées dans le métabolisme du glutathion, les mitochondries, la biosynthèse lipidique, la signalisation PPAR, le traitement antigénique et les réponses de protection (Alenghat *et al.*, 2013). Ces mêmes processus ont

été identifiés dans nos analyses d'ontologie des gènes identifiés par ARN-Seq et TMT, suggérant que HDAC1/2 et HDAC3, qui sont des HDAC de la même classe I, pourraient viser les mêmes cibles dans les CEI. Il est également important de rappeler que contrairement à une muqueuse inflammée, comme vu dans l'analyse des micropuces sur des extraits coloniques totaux (Turgeon *et al.*, 2014), la réponse inflammatoire semble inhibée dans les CEI en absence de *Hdac1* et de *Hdac2*. Cet effet ressemble aussi au phénotype des CEI sans *Hdac3* (Alenghat *et al.*, 2013).

Chez les souris délétées pour *Hdac1* et *Hdac2* dans les CEI, nous avons aussi observé, en plus de la voie de mTORC1, que celles de STAT3 et Notch sont suractivées. Dans les CEI, STAT3 pourrait être activé en permanence, donc localisé de façon constitutive au noyau des CEI, suite au recrutement accru des cellules immunitaires, comme les lymphocytes T, ou l'activation de cellules innées, comme les cellules « immune-like » (ILC) (Hanash *et al.*, 2012), qui assureraient une inflammation basale chronique. Ces cellules sont impliquées dans les mécanismes de réponse inflammatoire en produisant plusieurs cytokines, dont l'IL-6 ou l'IL-22. Comme mentionné précédemment, l'IL-22 est impliquée notamment dans la régénération de l'épithélium intestinal. En effet, l'IL-22 active la signalisation par l'intermédiaire de STAT3 et la prolifération dans des entéroïdes humains et murins. De même, l'IL-22 permet la réduction des dommages suite à l'interaction avec des pathogènes et la régénération des cellules souches intestinales dans un modèle murin de maladie de greffe contre l'hôte (Lindemans *et al.*, 2015). Il serait intéressant de déterminer par la suite l'importance de ces voies activées dans les CEI en l'absence de *Hdac1* et *Hdac2*, au niveau de l'inflammation chronique ou de l'hyperplasie, par exemple, en diminuant leur activation dans les souris mutantes, avec des inhibiteurs spécifiques de ces voies. Plusieurs essais cliniques en cours ciblent ces voies dans les pathologies inflammatoires (Curro *et al.*, 2017). L'inhibition du sentier JAK-STAT par le tofacitinib est utilisée pour le soin des patients atteints d'arthrite rhumatoïde modérée à sévère (Singh *et al.*, 2016), et plus récemment, de patients atteints de colite ulcéreuse (Sandborn *et al.*, 2017). L'inhibition de mTOR par l'inhibiteur AZD8055 atténue la colite induite par le DSS chez la souris, en supprimant la prolifération des lymphocytes T (Hu *et al.*, 2016). Cela nous fournirait des données importantes concernant les mécanismes

compensatoires mis en action lors de l'inactivation de *Hdac1* et *Hdac2* et pourrait raffiner les informations sur l'utilisation de HDACi au niveau pathologique et des traitements.

Chez la souris sans *Hdac1* et *Hdac2*, plusieurs voies associées à l'activation de la prolifération et à une activité de traduction accrue sont proposées par l'analyse bio-informatique comprenant les analyses d'ontologie des gènes et des prédictions URA, ainsi que par des analyses biochimiques utilisant différents marquages sur les échantillons de souris, comme l'analyse de la prolifération au BrdU ou de l'activation de la voie mTORC1 par phosphorylation de la protéine S6. Ces données s'opposent aux processus diminués dans les entéroïdes traités au CI994 qui comprennent l'initiation de la réplication de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et l'organisation chromosomique. Ces processus diminués sont, néanmoins, en accord avec la littérature sur l'effet négatif des HDACi sur la prolifération mais s'oppose au phénotype d'hyperprolifération du double mutant *Hdac1*^{-/-}; *Hdac2*^{-/-} Villine-Cre. Une étude sur le développement des entéroïdes à partir des cellules souches isolées Lgr5⁺-GFP a utilisé plusieurs HDACi afin de générer un modèle d'auto-renouvellement des cellules souches entraînant le maintien des entéroïdes dans un stade indifférencié. Les auteurs ont pu montrer que certains HDACi généraient davantage de cellules souches à faible dose, mais un effet inverse à des doses supérieures. Cette étude met donc en évidence un effet dose-réponse des HDAC sur la capacité proliférative des cellules souches (Yin *et al.*, 2014), et appuie nos résultats démontrant que des changements dans les niveaux d'expression de HDAC1 et de HDAC2 *in vivo* entraînent des modifications phénotypiques différentes (Gonneaud *et al.*, 2015) (Chapitre 1).

Concernant les entéroïdes délétés pour *Hdac1* ou pour *Hdac2*, nous avons aussi utilisé une approche protéomique afin d'identifier des voies principalement contrôlées par l'une ou l'autre HDAC intrinsèquement à la CEI. Ces voies semblent également regrouper des fonctions liées au métabolisme lipidique comme dans le modèle murin délété pour *Hdac1* et *Hdac2* (Chapitre 2), de même que certaines voies associées aux récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Pour les entéroïdes sans *Hdac1*, plusieurs voies métaboliques sont augmentées, en particulier celles liées à la β -oxydation ou à la dégradation de l'éthanol, deux voies permettant la production d'acétyl-CoA, le substrat énergétique et la source de

groupe acétyl (Pietrocola *et al.*, 2015). Nous avons déjà observé des perturbations métaboliques dans notre modèle de cellules IEC-6 shHDAC1 dans lequel le nombre de mitochondries était augmenté et dans lequel l'analyse protéomique indiquait un enrichissement des processus cataboliques (Gonneaud *et al.*, 2015). De même, dans le chapitre 1, nous avons observé par microscopie électronique, une augmentation du nombre de mitochondries dans les CEI du double mutant Villine-Cre. Une autre étude chez le rat a récemment démontré que le MPT0E014, un inhibiteur pharmacologique des HDAC de classe I, atténue significativement la cardiomyopathie induite par un diabète mellitus en modulant l'activité PPAR dans le cœur, le métabolisme des acides gras et l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Lee *et al.*, 2016). Les entéroïdes délétés pour *Hdac2* montrent, en plus, une activation de la signalisation AhR. Cette voie pourrait s'avérer protectrice lors de situation de stress inflammatoires (comme proposé plus haut) dans les entéroïdes. En opposition avec les souris sans *Hdac1* et *Hdac2*, la voie du régulateur NRF2 est prédite pour être activée, suggérant une activation de la réponse au stress oxydatif. Cela peut être dû à des défauts dans la production de métabolites, une hyperactivité mitochondriale ou une meilleure gestion des niveaux de métabolites (Zhang *et al.*, 2015). A propos des HDACi, l'analyse de l'ontologie des gènes des entéroïdes traités au CI994 (Chapitre 3) révèle également des processus augmentés principalement associés à des voies métaboliques, telles que l'oxydoréduction et le processus catabolique glucidique ainsi que plusieurs processus impliqués dans le métabolisme et l'absorption des sucres complexes. Au regard de l'aspect métabolisme lipidique, on observe des différences entre les entéroïdes délétés pour *Hdac1* ou pour *Hdac2* et le modèle *in vivo* sans *Hdac1* et *Hdac2*. Par exemple, dans les CEI *in vivo*, l'impact métabolique lipidique semble plus associé à une perturbation dans le transport des lipides et à une diminution de leur gestion alors que dans les entéroïdes, qui démontrent une activation de la β -oxydation, il se pourrait que les lipides soient davantage utilisés comme source d'énergie et/ou fournisseur d'acétyl-CoA. Par contre, dans les entéroïdes traités au CI994, on ne retrouve pas d'implication du métabolisme lipidique, contrairement aux autres modèles d'entéroïdes et du double mutant *in vivo* mais une redondance dans l'activation des mécanismes métaboliques de dégradation, principalement glucidique, avec les souris sans *Hdac1* et *Hdac2*.

Globalement, la perte *in vivo* de *Hdac1* et *Hdac2*, de *Hdac1* ou de *Hdac2* et l'inhibition des HDAC de classe I par le CI994 dans des entéroïdes affecteraient le métabolisme cellulaire, de façons différentes. Ces données suggèrent donc que l'environnement, bien que supportant la perte embryonnaire de *Hdac1* et *Hdac2* *in vivo*, ne peut pas empêcher les désordres métaboliques liés à la délétion génétique ou à l'inhibition pharmacologique de HDAC1 et de HDAC2.

Par la suite, il serait dès lors intéressant d'évaluer, dans ces entéroïdes, l'effet de facteurs environnementaux associés aux MII, spécifiquement sur les CEI, comme la réponse à des cytokines (IL-1 β , TNF α) (Grabinger *et al.*, 2014), des activateurs de l'immunité innée (LPS, flagelline) (Neal *et al.*, 2012) ainsi que d'autres produits bactériens (butyrate, MDP) (Lukovac *et al.*, 2014) (Nigro *et al.*, 2014). Nous pourrions ainsi vérifier si nous observons un caractère protecteur contre l'inflammation suite à la perte de *Hdac1* ou de *Hdac2* dans les entéroïdes.

D'un point de vue pathologique, les inhibiteurs pharmacologiques des régulateurs épigénétiques, y compris les HDACi, sont envisagés pour le traitement de diverses maladies, telles que le cancer et les maladies inflammatoires. Les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux HDACi, qui induisent l'arrêt de la croissance, la différenciation et l'apoptose en activant ou en réprimant l'expression des gènes de manière cellule- ou gène-spécifique. Les propriétés anti-inflammatoires des HDACi ont été démontrées dans des modèles de colite chez la souris (Cantley et Haynes, 2013). Par exemple, l'administration d'un pan-inhibiteur, le vorinostat, chez la souris réduit la colite induite par le DSS et le TNBS, en supprimant la production de cytokines proinflammatoires et en induisant l'apoptose des lymphocytes dans la muqueuse (Glauben *et al.*, 2006). De plus, l'inhibition des HDAC chez la souris, avec le pan-inhibiteur trichostatin A, active les cellules T-reg, des cellules immunitaires anti-inflammatoires, en corrélation avec une diminution des symptômes de colite induite par le DSS (Tao *et al.*, 2007). Il est donc clair que les HDACi ont un impact sur de nombreux types de cellules, y compris les CEI et les cellules immunitaires. Nos résultats chez la souris et dans les entéroïdes, montrant que HDAC1 et HDAC2 régularisent les fonctions des CEI, suggèrent que des HDACi pourraient

influencer la réponse intestinale inflammatoire via les CEI et que des inhibiteurs sélectifs d'isoforme HDAC pourraient être considérés pour les traitements anti-inflammatoires dans les MII chez l'homme.

Pour franchir ce palier, dans un futur développement, des entéroïdes mis en culture à partir de côlons de patients atteints de MII pourraient être utilisés, et analysés au niveau du protéome (Cristobal *et al.*, 2017). En outre, ces entéroïdes générés peuvent être utilisés pour évaluer de nouvelles approches thérapeutiques, comme avec des HDACi. Ces approches protéomiques peuvent être combinées à des études génétiques qui permettent l'étude du génome, l'identification des mutations et la caractérisation de l'expression des transcrits génétiques ainsi que leurs variants. L'information au niveau de la protéine est une autre dimension qui permet d'observer quantitativement les changements dans les voies fonctionnelles et les processus biologiques avec précision et sensibilité, et qui nous a permis, par exemple, d'identifier l'importance probable de voies de régulation post-traductionnelle dans nos modèles sans *Hdac1* et *Hdac2*. De plus, il est possible d'accéder à l'information non seulement au niveau de la protéine et de son abondance, mais aussi au niveau des modifications post-traductionnelles, de la localisation des protéines et des réseaux d'interaction (Gonneaud *et al.*, 2017). Une fois que nous aurons clarifié si l'inhibition de HDAC2 et/ou HDAC1 dans les entéroïdes diminue la réponse inflammatoire, corrélant avec l'effet protecteur observé dans les souris *Hdac2*^{-/-} Villine-Cre lors d'une colite induite, nous pourrions mettre en place des essais ciblant HDAC2 dans des entéroïdes de patients MII. Le ciblage de HDAC2 pourra être réalisé par différentes approches, notamment l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, par approche anti-sens ou par adressage spécifique de ces inhibiteurs en utilisant des nanoparticules fonctionnalisées et adressables aux CEI.

7. CONCLUSION

L'activité des modulateurs épigénétiques, comme HDAC1 et HDAC2, peut être influencée par différentes molécules synthétiques ou naturelles. En se plaçant dans un contexte humain au niveau des traitements ou au niveau diagnostique, la découverte et/ou le suivi d'un effet HDAC-dépendant chez un patient seront facilités par l'identification des voies de signalisation contrôlées par ces HDAC grâce aux approches -omics, soit *in vivo*, par exemple avec des biopsies, soit *in cellulo*, par la culture d'organoïdes. La compréhension des mécanismes cellulaires régulés par HDAC1 et/ou HDAC2 dans les CEI nous a permis d'affiner nos connaissances afin de développer de nouveaux traitements épigénétiques visant l'intestin notamment, dans un contexte d'inflammation, aigüe ou chronique.

Remerciements

J'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce vaste projet ! Tout d'abord aux membres de mes laboratoires : j'aimerais remercier mes directeurs de recherche, Pr Claude Asselin et Pr François Boudreau, qui m'ont accueilli au PhD. Merci pour cette transmission de savoir, du plaisir de faire de la science et de toujours voir plus loin. Merci aux assistantes de recherche Naomie et Christine, sans lesquelles ma progression aurait été vraiment plus fastidieuse, merci les filles pour tout le temps que vous m'avez consacré ! Merci également à JP (qui a évolué d'étudiant à assistant de recherche) pour ton aide en bio info et ton soutien en congrès. Et merci à tous les étudiants pour leur support moral et la bonne ambiance que ce soit au labo ou en soirée.

Je tenais également à remercier les membres de mon comité d'encadrement, Pr François-Michel Boisvert et le Pr Pedro-Miguel Geraldès, pour leur support et le bon déroulement de cette thèse.

Merci aux membres du jury, Pr Jacques J. Tremblay, Pr Pedro-Miguel Geraldès et Pr Steve Jean, pour avoir accepté de participer à l'évaluation de cette thèse, au temps accordé et aux conseils prodigués.

Merci également à l'équipe du Pr Fernand-Pierre Gendron avec laquelle nous partageons ce fameux local 2034 où règnent la joie et la bonne humeur.

Je remercie le corps professoral ainsi que tous les étudiants et employés du Département d'anatomie et de biologie cellulaire pour leur soutien, notamment les plates formes d'histologie et spectrométrie de masse ! Merci tonton Dom pour toutes ces heures passées à regarder avec moi des spectres de masse et des fichiers Excel.

Enfin un grand merci à mes parents, mon frangin et les autres membres de ma famille pour leur soutien et leurs encouragements et ce malgré la distance (merci Skype pour la vidéo !). Et à Aurélie qui est là en permanence pour tout.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." *Nat Rev Immunol* **10**(2): 131-144.
- Albert, P. R. (2011). "What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality." *J Psychiatry Neurosci* **36**(6): 363-365.
- Alenghat, T. et D. Artis (2014). "Epigenomic regulation of host-microbiota interactions." *Trends Immunol* **35**(11): 518-525.
- Alenghat, T., L. C. Osborne, S. A. Saenz, D. Kobuley, C. G. Ziegler, S. E. Mullican, I. Choi, S. Grunberg, R. Sinha, M. Wynosky-Dolfi, A. Snyder, P. R. Giacomin, K. L. Joyce, T. B. Hoang, M. Bewtra, I. E. Brodsky, G. F. Sonnenberg, F. D. Bushman, K. J. Won, M. A. Lazar et D. Artis (2013). "Histone deacetylase 3 coordinates commensal-bacteria-dependent intestinal homeostasis." *Nature* **504**(7478): 153-157.
- Allis, C. D. et T. Jenuwein (2016). "The molecular hallmarks of epigenetic control." *Nat Rev Genet* **17**(8): 487-500.
- Ashburner, B. P., S. D. Westerheide et A. S. Baldwin, Jr. (2001). "The p53 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression." *Mol Cell Biol* **21**(20): 7065-7077.
- Asselin, C. et F. P. Gendron (2014). "Shuttling of information between the mucosal and luminal environment drives intestinal homeostasis." *FEBS Lett* **588**(22): 4148-4157.
- Badeaux, A. I. et Y. Shi (2013). "Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(4): 211-224.
- Bakalarski, C. E. et D. S. Kirkpatrick (2016). "A Biologist's Field Guide to Multiplexed Quantitative Proteomics." *Mol Cell Proteomics* **15**(5): 1489-1497.
- Bannister, A. J. et T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." *Cell Res* **21**(3): 381-395.
- Bantscheff, M., C. Hopf, M. M. Savitski, A. Dittmann, P. Grandi, A. M. Michon, J. Schlegl, Y. Abraham, I. Becher, G. Bergamini, M. Boesche, M. Delling, B. Dumpelfeld, D. Eberhard, C. Huthmacher, T. Mathieson, D. PoECKel, V. Reader, K. Strunk, G. Sweetman, U. Kruse, G. Neubauer, N. G. Ramsden et G. Drewes (2011). "Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes." *Nat Biotechnol* **29**(3): 255-265.
- Barker, N. (2014). "Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(1): 19-33.
- Barker, N., J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegbarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters et H. Clevers (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*." *Nature* **449**(7165): 1003-1007.
- Bartfeld, S., T. Bayram, M. van de Wetering, M. Huch, H. Begthel, P. Kujala, R. Vries, P. J. Peters et H. Clevers (2015). "In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection." *Gastroenterology* **148**(1): 126-136 e126.
- Barth, T. K. et A. Imhof (2010). "Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications." *Trends Biochem Sci* **35**(11): 618-626.

- Beckers, T., C. Burkhardt, H. Wieland, P. Gimmnich, T. Ciossek, T. Maier et K. Sanders (2007). "Distinct pharmacological properties of second generation HDAC inhibitors with the benzamide or hydroxamate head group." *Int J Cancer* **121**(5): 1138-1148.
- Bhaskara, S. (2015). "Histone deacetylases 1 and 2 regulate DNA replication and DNA repair: potential targets for genome stability-mechanism-based therapeutics for a subset of cancers." *Cell Cycle* **14**(12): 1779-1785.
- Bhaskara, S., V. Jacques, J. R. Rusche, E. N. Olson, B. R. Cairns et M. B. Chandrasekharan (2013). "Histone deacetylases 1 and 2 maintain S-phase chromatin and DNA replication fork progression." *Epigenetics Chromatin* **6**(1): 27.
- Boj, S. F., C. I. Hwang, L. A. Baker, Chio, II, D. D. Engle, V. Corbo, M. Jager, M. Ponz-Sarvisé, H. Tiriác, M. S. Spector, A. Gracanin, T. Oni, K. H. Yu, R. van Boxtel, M. Huch, K. D. Rivera, J. P. Wilson, M. E. Feigin, D. Ohlund, A. Handly-Santana, C. M. Ardito-Abraham, M. Ludwig, E. Elyada, B. Alagesan, G. Biffi, G. N. Yordanov, B. Delcuze, B. Creighton, K. Wright, Y. Park, F. H. Morsink, I. Q. Molenaar, I. H. Borel Rinkes, E. Cuppen, Y. Hao, Y. Jin, I. J. Nijman, C. Iacobuzio-Donahue, S. D. Leach, D. J. Pappin, M. Hammell, D. S. Klimstra, O. Basturk, R. H. Hruban, G. J. Offerhaus, R. G. Vries, H. Clevers et D. A. Tuveson (2015). "Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer." *Cell* **160**(1-2): 324-338.
- Boudreau, F., C. R. Lussier, S. Mongrain, M. Darsigny, J. L. Drouin, G. Doyon, E. R. Suh, J. F. Beaulieu, N. Rivard et N. Perreault (2007). "Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia." *FASEB J* **21**(14): 3853-3865.
- Bracha, A. L., A. Ramanathan, S. Huang, D. E. Ingber et S. L. Schreiber (2010). "Carbon metabolism-mediated myogenic differentiation." *Nat Chem Biol* **6**(3): 202-204.
- Calo, E. et J. Wysocka (2013). "Modification of enhancer chromatin: what, how, and why?" *Mol Cell* **49**(5): 825-837.
- Cantley, M. D. et D. R. Haynes (2013). "Epigenetic regulation of inflammation: progressing from broad acting histone deacetylase (HDAC) inhibitors to targeting specific HDACs." *Inflammopharmacology* **21**(4): 301-307.
- Cash, H. L., C. V. Whitham, C. L. Behrendt et L. V. Hooper (2006). "Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin." *Science* **313**(5790): 1126-1130.
- Cenit, M. C., A. Alcina, A. Marquez, J. L. Mendoza, M. Diaz-Rubio, V. de las Heras, G. Izquierdo, R. Arroyo, O. Fernandez, E. G. de la Concha, F. Matesanz et E. Urcelay (2010). "STAT3 locus in inflammatory bowel disease and multiple sclerosis susceptibility." *Genes Immun* **11**(3): 264-268.
- Chang, P. V., L. Hao, S. Offermanns et R. Medzhitov (2014). "The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(6): 2247-2252.
- Chen, T. et S. Y. Dent (2014). "Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation." *Nat Rev Genet* **15**(2): 93-106.
- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnäd, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen et M. Mann (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." *Science* **325**(5942): 834-840.
- Choudhary, C., B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin et M. Mann (2014). "The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(8): 536-550.

- Clevers, H. (2016). "Modeling Development and Disease with Organoids." *Cell* **165**(7): 1586-1597.
- Clevers, H. C. et C. L. Bevins (2013). "Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts." *Annu Rev Physiol* **75**: 289-311.
- Cleynen, I. et S. Vermeire (2015). "The genetic architecture of inflammatory bowel disease: past, present and future." *Curr Opin Gastroenterol* **31**(6): 456-463.
- Contreras, A. V., N. Torres et A. R. Tovar (2013). "PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation." *Adv Nutr* **4**(4): 439-452.
- Cooper, H. S., S. N. Murthy, R. S. Shah et D. J. Sedergran (1993). "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis." *Lab Invest* **69**(2): 238-249.
- Cox, J. et M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." *Nat Biotechnol* **26**(12): 1367-1372.
- Cristobal, A., H. W. van den Toorn, M. van de Wetering, H. Clevers, A. J. Heck et S. Mohammed (2017). "Personalized Proteome Profiles of Healthy and Tumor Human Colon Organoids Reveal Both Individual Diversity and Basic Features of Colorectal Cancer." *Cell Rep* **18**(1): 263-274.
- Curro, D., D. Pugliese et A. Armuzzi (2017). "Frontiers in Drug Research and Development for Inflammatory Bowel Disease." *Front Pharmacol* **8**: 400.
- Date, S. et T. Sato (2015). "Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche." *Annu Rev Cell Dev Biol* **31**: 269-289.
- Davie, J. R. (2003). "Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate." *J Nutr* **133**(7 Suppl): 2485S-2493S.
- de Zoeten, E. F., L. Wang, K. Butler, U. H. Beier, T. Akimova, H. Sai, J. E. Bradner, R. Mazitschek, A. P. Kozikowski, P. Matthias et W. W. Hancock (2011). "Histone deacetylase 6 and heat shock protein 90 control the functions of Foxp3(+) T-regulatory cells." *Mol Cell Biol* **31**(10): 2066-2078.
- de Zoeten, E. F., L. Wang, H. Sai, W. H. Dillmann et W. W. Hancock (2010). "Inhibition of HDAC9 increases T regulatory cell function and prevents colitis in mice." *Gastroenterology* **138**(2): 583-594.
- Dedhia, P. H., N. Bertaux-Skeirik, Y. Zavros et J. R. Spence (2016). "Organoid Models of Human Gastrointestinal Development and Disease." *Gastroenterology* **150**(5): 1098-1112.
- Delcuve, G. P., D. H. Khan et J. R. Davie (2012). "Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors." *Clin Epigenetics* **4**(1): 5.
- Deng, L., J. F. Zhou, R. S. Sellers, J. F. Li, A. V. Nguyen, Y. Wang, A. Orlofsky, Q. Liu, D. A. Hume, J. W. Pollard, L. Augenlicht et E. Y. Lin (2010). "A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to inflammation-associated tumorigenesis." *Am J Pathol* **176**(2): 952-967.
- Dennis, G., Jr., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane et R. A. Lempicki (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery." *Genome Biol* **4**(5): P3.
- Deubzer, H. E., M. C. Schier, I. Oehme, M. Lodrini, B. Haendler, A. Sommer et O. Witt (2013). "HDAC11 is a novel drug target in carcinomas." *Int J Cancer* **132**(9): 2200-2208.

- Dovey, O. M., C. T. Foster, N. Conte, S. A. Edwards, J. M. Edwards, R. Singh, G. Vassiliou, A. Bradley et S. M. Cowley (2013). "Histone deacetylase 1 and 2 are essential for normal T-cell development and genomic stability in mice." *Blood* **121**(8): 1335-1344.
- Drissi, R., M. L. Dubois, M. Douziech et F. M. Boisvert (2015). "Quantitative Proteomics Reveals Dynamic Interactions of the Minichromosome Maintenance Complex (MCM) in the Cellular Response to Etoposide Induced DNA Damage." *Mol Cell Proteomics* **14**(7): 2002-2013.
- Drost, J., R. H. van Jaarsveld, B. Ponsioen, C. Zimmerlin, R. van Boxtel, A. Buijs, N. Sachs, R. M. Overmeer, G. J. Offerhaus, H. Begthel, J. Korving, M. van de Wetering, G. Schwank, M. Logtenberg, E. Cuppen, H. J. Snippert, J. P. Medema, G. J. Kops et H. Clevers (2015). "Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells." *Nature* **521**(7550): 43-47.
- Durand, A., B. Donahue, G. Peignon, F. Letourneur, N. Cagnard, C. Slomianny, C. Perret, N. F. Shroyer et B. Romagnolo (2012). "Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(23): 8965-8970.
- Dye, B. R., D. R. Hill, M. A. Ferguson, Y. H. Tsai, M. S. Nagy, R. Dyal, J. M. Wells, C. N. Mayhew, R. Nattiv, O. D. Klein, E. S. White, G. H. Deutsch et J. R. Spence (2015). "In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids." *Elife* **4**.
- Eckschlager, T., J. Plch, M. Stiborova et J. Hrabeta (2017). "Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs." *Int J Mol Sci* **18**(7).
- Edwards, A. J. et S. L. Pender (2011). "Histone deacetylase inhibitors and their potential role in inflammatory bowel diseases." *Biochem Soc Trans* **39**(4): 1092-1095.
- el Marjou, F., K. P. Janssen, B. H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger et S. Robine (2004). "Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium." *Genesis* **39**(3): 186-193.
- Elia, P. P., Y. F. Tolentino, C. Bernardazzi et H. S. de Souza (2015). "The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Mediators Inflamm* **2015**: 936193.
- Fafilek, B., M. Krausova, M. Vojtechova, V. Pospichalova, L. Tumova, E. Sloncova, M. Huranova, J. Stancikova, A. Hlavata, J. Svec, R. Sedlacek, O. Luksan, M. Oliverius, L. Voska, M. Jirsa, J. Paces, M. Kolar, M. Krivjanska, K. Klimesova, H. Tlaskalova-Hogenova et V. Korinek (2013). "Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with lgr5 to inhibit wnt signaling in intestinal stem cells." *Gastroenterology* **144**(2): 381-391.
- Falkenberg, K. J. et R. W. Johnstone (2014). "Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders." *Nat Rev Drug Discov* **13**(9): 673-691.
- Fallarino, F., L. Romani et P. Puccetti (2014). "AhR: far more than an environmental sensor." *Cell Cycle* **13**(17): 2645-2646.
- Farin, H. F., J. H. Van Es et H. Clevers (2012). "Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells." *Gastroenterology* **143**(6): 1518-1529 e1517.
- Fatehullah, A., S. H. Tan et N. Barker (2016). "Organoids as an in vitro model of human development and disease." *Nat Cell Biol* **18**(3): 246-254.

- Feil, R. et M. F. Fraga (2012). "Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications." *Nat Rev Genet* **13**(2): 97-109.
- Felice, C., A. Lewis, A. Armuzzi, J. O. Lindsay et A. Silver (2015). "Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases." *Aliment Pharmacol Ther* **41**(1): 26-38.
- Fenton, T. R., J. Gwalter, J. Ericsson et I. T. Gout (2010). "Histone acetyltransferases interact with and acetylate p70 ribosomal S6 kinases in vitro and in vivo." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(2): 359-366.
- Filippakopoulos, P. et S. Knapp (2014). "Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation." *Nat Rev Drug Discov* **13**(5): 337-356.
- Foersch, S., M. J. Waldner et M. F. Neurath (2013). "Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel diseases." *Dig Dis* **31**(3-4): 317-320.
- Furumatsu, K., S. Nishiumi, Y. Kawano, M. Ooi, T. Yoshie, Y. Shiomi, H. Kutsumi, H. Ashida, Y. Fujii-Kuriyama, T. Azuma et M. Yoshida (2011). "A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis." *Dig Dis Sci* **56**(9): 2532-2544.
- Galdieri, L., T. Zhang, D. Rogerson, R. Lleshi et A. Vancura (2014). "Protein acetylation and acetyl coenzyme a metabolism in budding yeast." *Eukaryot Cell* **13**(12): 1472-1483.
- Galmozzi, A., N. Mitro, A. Ferrari, E. Gers, F. Gilardi, C. Godio, G. Cermenati, A. Gualerzi, E. Donetti, D. Rotili, S. Valente, U. Guerrini, D. Caruso, A. Mai, E. Saez, E. De Fabiani et M. Crestani (2013). "Inhibition of class I histone deacetylases unveils a mitochondrial signature and enhances oxidative metabolism in skeletal muscle and adipose tissue." *Diabetes* **62**(3): 732-742.
- Glauben, R., A. Batra, I. Fedke, M. Zeitz, H. A. Lehr, F. Leoni, P. Mascagni, G. Fantuzzi, C. A. Dinarello et B. Siegmund (2006). "Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice." *J Immunol* **176**(8): 5015-5022.
- Glauben, R., A. Batra, T. Stroh, U. Erben, I. Fedke, H. A. Lehr, F. Leoni, P. Mascagni, C. A. Dinarello, M. Zeitz et B. Siegmund (2008). "Histone deacetylases: novel targets for prevention of colitis-associated cancer in mice." *Gut* **57**(5): 613-622.
- Glauben, R. et B. Siegmund (2011). "Inhibition of histone deacetylases in inflammatory bowel diseases." *Mol Med* **17**(5-6): 426-433.
- Glauben, R., E. Sonnenberg, M. Wetzel, P. Mascagni et B. Siegmund (2014). "Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4+ T cell polarization in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **289**(9): 6142-6151.
- Gonneaud, A., C. Asselin, F. Boudreau et F. M. Boisvert (2017). "Phenotypic analysis of organoids by proteomics." *Proteomics*.
- Gonneaud, A., J. M. Gagne, N. Turgeon et C. Asselin (2014). "The histone deacetylase Hdac1 regulates inflammatory signalling in intestinal epithelial cells." *J Inflamm (Lond)* **11**(1): 43.
- Gonneaud, A., C. Jones, N. Turgeon, D. Levesque, C. Asselin, F. Boudreau et F. M. Boisvert (2016). "A SILAC-Based Method for Quantitative Proteomic Analysis of Intestinal Organoids." *Sci Rep* **6**: 38195.
- Gonneaud, A., N. Turgeon, F. M. Boisvert, F. Boudreau et C. Asselin (2015). "Loss of histone deacetylase Hdac1 disrupts metabolic processes in intestinal epithelial cells." *FEBS Lett* **589**(19 Pt B): 2776-2783.

- Gonneaud, A., N. Turgeon, F. Boudreau, N. Perreault, N. Rivard et C. Asselin (2015). "Distinct Roles for Intestinal Epithelial Cell-Specific Hdac1 and Hdac2 in the Regulation of Murine Intestinal Homeostasis." *J Cell Physiol*.
- Goodell, M. A., H. Nguyen et N. Shroyer (2015). "Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(5): 299-309.
- Grabinger, T., L. Luks, F. Kostadinova, C. Zimmerlin, J. P. Medema, M. Leist et T. Brunner (2014). "Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy." *Cell Death Dis* **5**: e1228.
- Graham, D. B. et R. J. Xavier (2013). "From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights." *Trends Immunol* **34**(8): 371-378.
- Gribble, F. M. et F. Reimann (2016). "Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium." *Annu Rev Physiol* **78**: 277-299.
- Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann et M. Karin (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." *Cancer Cell* **15**(2): 103-113.
- Guarani, V., G. Deflorian, C. A. Franco, M. Kruger, L. K. Phng, K. Bentley, L. Toussaint, F. Dequiedt, R. Mostoslavsky, M. H. Schmidt, B. Zimmermann, R. P. Brandes, M. Mione, C. H. Westphal, T. Braun, A. M. Zeiher, H. Gerhardt, S. Dimmeler et M. Potente (2011). "Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase." *Nature* **473**(7346): 234-238.
- Hagelkruys, A., S. Lagger, J. Krahmer, A. Leopoldi, M. Artaker, O. Pusch, J. Zezula, S. Weissmann, Y. Xie, C. Schofer, M. Schlederer, G. Brosch, P. Matthias, J. Selfridge, H. Lassmann, J. A. Knoblich et C. Seiser (2014). "A single allele of Hdac2 but not Hdac1 is sufficient for normal mouse brain development in the absence of its paralog." *Development* **141**(3): 604-616.
- Hait, N. C., J. Allegood, M. Maceyka, G. M. Strub, K. B. Harikumar, S. K. Singh, C. Luo, R. Marmorstein, T. Kordula, S. Milstien et S. Spiegel (2009). "Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate." *Science* **325**(5945): 1254-1257.
- Halili, M. A., M. R. Andrews, M. J. Sweet et D. P. Fairlie (2009). "Histone deacetylase inhibitors in inflammatory disease." *Curr Top Med Chem* **9**(3): 309-319.
- Halkidou, K., L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal et C. N. Robson (2004). "Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer." *Prostate* **59**(2): 177-189.
- Hanash, A. M., J. A. Dudakov, G. Hua, M. H. O'Connor, L. F. Young, N. V. Singer, M. L. West, R. R. Jenq, A. M. Holland, L. W. Kappel, A. Ghosh, J. J. Tsai, U. K. Rao, N. L. Yim, O. M. Smith, E. Velardi, E. B. Hawryluk, G. F. Murphy, C. Liu, L. A. Fouser, R. Kolesnick, B. R. Blazar et M. R. van den Brink (2012). "Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease." *Immunity* **37**(2): 339-350.
- Hao, N. et M. L. Whitelaw (2013). "The emerging roles of AhR in physiology and immunity." *Biochem Pharmacol* **86**(5): 561-570.
- Hardie, D. G. (2011). "AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function." *Genes Dev* **25**(18): 1895-1908.

- Ho, E. et R. H. Dashwood (2010). "Dietary manipulation of histone structure and function." *World Rev Nutr Diet* **101**: 95-102.
- Hong, S., B. Zhao, D. B. Lombard, D. C. Fingar et K. Inoki (2014). "Cross-talk between sirtuin and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in the regulation of S6 kinase 1 (S6K1) phosphorylation." *J Biol Chem* **289**(19): 13132-13141.
- Hu, S., M. Chen, Y. Wang, Z. Wang, Y. Pei, R. Fan, X. Liu, L. Wang, J. Zhou, S. Zheng, T. Zhang, Y. Lin, M. Zhang, R. Tao et J. Zhong (2016). "mTOR Inhibition Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Suppressing T Cell Proliferation and Balancing TH1/TH17/Treg Profile." *PLoS One* **11**(4): e0154564.
- Huang, H., N. Liu, H. Guo, S. Liao, X. Li, C. Yang, S. Liu, W. Song, C. Liu, L. Guan, B. Li, L. Xu, C. Zhang, X. Wang, Q. P. Dou et J. Liu (2012). "L-carnitine is an endogenous HDAC inhibitor selectively inhibiting cancer cell growth in vivo and in vitro." *PLoS One* **7**(11): e49062.
- Huang, L., A. Holtzinger, I. Jagan, M. BeGora, I. Lohse, N. Ngai, C. Nostro, R. Wang, L. B. Muthuswamy, H. C. Crawford, C. Arrowsmith, S. E. Kalloger, D. J. Renouf, A. A. Connor, S. Cleary, D. F. Schaeffer, M. Roehrl, M. S. Tsao, S. Gallinger, G. Keller et S. K. Muthuswamy (2015). "Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids." *Nat Med* **21**(11): 1364-1371.
- Huch, M., C. Dorrell, S. F. Boj, J. H. van Es, V. S. Li, M. van de Wetering, T. Sato, K. Hamer, N. Sasaki, M. J. Finegold, A. Haft, R. G. Vries, M. Grompe et H. Clevers (2013). "In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration." *Nature* **494**(7436): 247-250.
- Hughes, C. S., L. M. Postovit et G. A. Lajoie (2010). "Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture." *Proteomics* **10**(9): 1886-1890.
- Hynds, R. E. et A. Giangreco (2013). "Concise review: the relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine." *Stem Cells* **31**(3): 417-422.
- Ireland, H., R. Kemp, C. Houghton, L. Howard, A. R. Clarke, O. J. Sansom et D. J. Winton (2004). "Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin." *Gastroenterology* **126**(5): 1236-1246.
- Ivashkevich, A., C. E. Redon, A. J. Nakamura, R. F. Martin et O. A. Martin (2012). "Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research." *Cancer Lett* **327**(1-2): 123-133.
- Jamaladdin, S., R. D. Kelly, L. O'Regan, O. M. Dovey, G. E. Hodson, C. J. Millard, N. Portolano, A. M. Fry, J. W. Schwabe et S. M. Cowley (2014). "Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(27): 9840-9845.
- Jiang, H., P. H. Patel, A. Kohlmaier, M. O. Grenley, D. G. McEwen et B. A. Edgar (2009). "Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut." *Cell* **137**(7): 1343-1355.
- Johansson, M. E., H. Sjovall et G. C. Hansson (2013). "The gastrointestinal mucus system in health and disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**(6): 352-361.
- Jostins, L., S. Ripke, R. K. Weersma, R. H. Duerr, D. P. McGovern, K. Y. Hui, J. C. Lee, L. P. Schumm, Y. Sharma, C. A. Anderson, J. Essers, M. Mitrovic, K. Ning, I. Cleynen, E. Theatre, S. L. Spain, S. Raychaudhuri, P. Goyette, Z. Wei, C. Abraham, J. P. Achkar, T. Ahmad, L. Amininejad, A. N. Ananthakrishnan, V. Andersen, J. M. Andrews, L. Baidoo, T. Balschun, P. A. Bampton, A. Bitton, G. Boucher, S. Brand, C. Buning, A. Cohain, S.

- Cichon, M. D'Amato, D. De Jong, K. L. Devaney, M. Dubinsky, C. Edwards, D. Ellinghaus, L. R. Ferguson, D. Franchimont, K. Fransen, R. Gearry, M. Georges, C. Gieger, J. Glas, T. Haritunians, A. Hart, C. Hawkey, M. Hedl, X. Hu, T. H. Karlsen, L. Kupcinskis, S. Kugathasan, A. Latiano, D. Laukens, I. C. Lawrance, C. W. Lees, E. Louis, G. Mahy, J. Mansfield, A. R. Morgan, C. Mowat, W. Newman, O. Palmieri, C. Y. Ponsioen, U. Potocnik, N. J. Prescott, M. Regueiro, J. I. Rotter, R. K. Russell, J. D. Sanderson, M. Sans, J. Satsangi, S. Schreiber, L. A. Simms, J. Sventoraityte, S. R. Targan, K. D. Taylor, M. Tremelling, H. W. Verspaget, M. De Vos, C. Wijmenga, D. C. Wilson, J. Winkelmann, R. J. Xavier, S. Zeissig, B. Zhang, C. K. Zhang, H. Zhao, I. B. D. G. C. International, M. S. Silverberg, V. Annese, H. Hakonarson, S. R. Brant, G. Radford-Smith, C. G. Mathew, J. D. Rioux, E. E. Schadt, M. J. Daly, A. Franke, M. Parkes, S. Vermeire, J. C. Barrett et J. H. Cho (2012). "Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease." *Nature* **491**(7422): 119-124.
- Jurkin, J., G. Zupkovitz, S. Lagger, R. Grausenburger, A. Hagelkruys, L. Kenner et C. Seiser (2011). "Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis." *Cell Cycle* **10**(3): 406-412.
- Kabiri, Z., G. Greicius, B. Madan, S. Biechele, Z. Zhong, H. Zaribafzadeh, Edison, J. Aliyev, Y. Wu, R. Bunte, B. O. Williams, J. Rossant et D. M. Virshup (2014). "Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts." *Development* **141**(11): 2206-2215.
- Kaelin, W. G., Jr. et S. L. McKnight (2013). "Influence of metabolism on epigenetics and disease." *Cell* **153**(1): 56-69.
- Kaiko, G. E., S. H. Ryu, O. I. Koues, P. L. Collins, L. Solnica-Krezel, E. J. Pearce, E. L. Pearce, E. M. Oltz et T. S. Stappenbeck (2016). "The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites." *Cell* **167**(4): 1137.
- Karin, M. et H. Clevers (2016). "Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration." *Nature* **529**(7586): 307-315.
- Kaser, A., A. H. Lee, A. Franke, J. N. Glickman, S. Zeissig, H. Tilg, E. E. Nieuwenhuis, D. E. Higgins, S. Schreiber, L. H. Glimcher et R. S. Blumberg (2008). "XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease." *Cell* **134**(5): 743-756.
- Kawasaki, T. et T. Kawai (2014). "Toll-like receptor signaling pathways." *Front Immunol* **5**: 461.
- Ke, Q., R. N. Yang, F. Ye, Y. J. Wang, Q. Wu, L. Li et H. Bu (2012). "Impairment of liver regeneration by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in mice." *J Zhejiang Univ Sci B* **13**(9): 695-706.
- Keilbaugh, S. A., M. E. Shin, R. F. Banchereau, L. D. McVay, N. Boyko, D. Artis, J. J. Cebra et G. D. Wu (2005). "Activation of RegIIIbeta/gamma and interferon gamma expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut." *Gut* **54**(5): 623-629.
- Kellermayer, R. (2012). "Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases." *Can J Gastroenterol* **26**(12): 909-915.
- Kelly, R. D. et S. M. Cowley (2013). "The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts." *Biochem Soc Trans* **41**(3): 741-749.

- Khor, B., A. Gardet et R. J. Xavier (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* **474**(7351): 307-317.
- Kim, T. H., F. Li, I. Ferreira-Neira, L. L. Ho, A. Luyten, K. Nalapareddy, H. Long, M. Verzi et R. A. Shivdasani (2014). "Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity." *Nature* **506**(7489): 511-515.
- Kitteringham, N. R., A. Abdullah, J. Walsh, L. Randle, R. E. Jenkins, R. Sison, C. E. Goldring, H. Powell, C. Sanderson, S. Williams, L. Higgins, M. Yamamoto, J. Hayes et B. K. Park (2010). "Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver." *J Proteomics* **73**(8): 1612-1631.
- Kizil, C., N. Kyritsis et M. Brand (2015). "Effects of inflammation on stem cells: together they strive?" *EMBO Rep* **16**(4): 416-426.
- Koo, B. K., M. Spit, I. Jordens, T. Y. Low, D. E. Stange, M. van de Wetering, J. H. van Es, S. Mohammed, A. J. Heck, M. M. Maurice et H. Clevers (2012). "Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors." *Nature* **488**(7413): 665-669.
- Kramer, A., J. Green, J. Pollard, Jr. et S. Tugendreich (2014). "Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis." *Bioinformatics* **30**(4): 523-530.
- Kuhnert, F., C. R. Davis, H. T. Wang, P. Chu, M. Lee, J. Yuan, R. Nusse et C. J. Kuo (2004). "Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 266-271.
- Labrecque, M. P., G. G. Prefontaine et T. V. Beischlag (2013). "The aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) family of proteins: transcriptional modifiers with multi-functional protein interfaces." *Curr Mol Med* **13**(7): 1047-1065.
- Lagger, G., D. O'Carroll, M. Rembold, H. Khier, J. Tischler, G. Weitzer, B. Schuettengruber, C. Hauser, R. Brunmeir, T. Jenuwein et C. Seiser (2002). "Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression." *EMBO J* **21**(11): 2672-2681.
- Lancaster, M. A., M. Renner, C. A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson et J. A. Knoblich (2013). "Cerebral organoids model human brain development and microcephaly." *Nature* **501**(7467): 373-379.
- Lapante, M. et D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." *Cell* **149**(2): 274-293.
- Laugesen, A. et K. Helin (2014). "Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer." *Cell Stem Cell* **14**(6): 735-751.
- LeBoeuf, M., A. Terrell, S. Trivedi, S. Sinha, J. A. Epstein, E. N. Olson, E. E. Morrisey et S. E. Millar (2010). "Hdac1 and Hdac2 act redundantly to control p63 and p53 functions in epidermal progenitor cells." *Dev Cell* **19**(6): 807-818.
- Lee, J. I., H. Nian, A. J. Cooper, R. Sinha, J. Dai, W. H. Bisson, R. H. Dashwood et J. T. Pinto (2009). "Alpha-keto acid metabolites of naturally occurring organoselenium compounds as inhibitors of histone deacetylase in human prostate cancer cells." *Cancer Prev Res (Phila)* **2**(7): 683-693.
- Lee, T. I., Y. H. Kao, W. C. Tsai, C. C. Chung, Y. C. Chen et Y. J. Chen (2016). "HDAC Inhibition Modulates Cardiac PPARs and Fatty Acid Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy." *PPAR Res* **2016**: 5938740.

- Li, A. C. et C. K. Glass (2004). "PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis." *J Lipid Res* **45**(12): 2161-2173.
- Licciardi, P. V., S. S. Wong, M. L. Tang et T. C. Karagiannis (2010). "Epigenome targeting by probiotic metabolites." *Gut Pathog* **2**(1): 24.
- Lin, L., A. Liu, Z. Peng, H. J. Lin, P. K. Li, C. Li et J. Lin (2011). "STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells." *Cancer Res* **71**(23): 7226-7237.
- Lin, N., L. F. Xu et M. Sun (2013). "The protective effect of trefoil factor 3 on the intestinal tight junction barrier is mediated by toll-like receptor 2 via a PI3K/Akt dependent mechanism." *Biochem Biophys Res Commun* **440**(1): 143-149.
- Lindemans, C. A., M. Calafiore, A. M. Mertelsmann, M. H. O'Connor, J. A. Dudakov, R. R. Jenq, E. Velardi, L. F. Young, O. M. Smith, G. Lawrence, J. A. Ivanov, Y. Y. Fu, S. Takashima, G. Hua, M. L. Martin, K. P. O'Rourke, Y. H. Lo, M. Mokry, M. Romera-Hernandez, T. Cupedo, L. Dow, E. E. Nieuwenhuis, N. F. Shroyer, C. Liu, R. Kolesnick, M. R. M. van den Brink et A. M. Hanash (2015). "Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration." *Nature* **528**(7583): 560-564.
- Ling, C. et L. Groop (2009). "Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes." *Diabetes* **58**(12): 2718-2725.
- Losson, H., M. Schnekenburger, M. Dicato et M. Diederich (2016). "Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer." *Molecules* **21**(11).
- Lukovac, S., C. Belzer, L. Pellis, B. J. Keijser, W. M. de Vos, R. C. Montijn et G. Roeselers (2014). "Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids." *MBio* **5**(4).
- Luo, Y., K. M. de Lange, L. Jostins, L. Moutsianas, J. Randall, N. A. Kennedy, C. A. Lamb, S. McCarthy, T. Ahmad, C. Edwards, E. G. Serra, A. Hart, C. Hawkey, J. C. Mansfield, C. Mowat, W. G. Newman, S. Nichols, M. Pollard, J. Satsangi, A. Simmons, M. Tremelling, H. Uhlig, D. C. Wilson, J. C. Lee, N. J. Prescott, C. W. Lees, C. G. Mathew, M. Parkes, J. C. Barrett et C. A. Anderson (2017). "Exploring the genetic architecture of inflammatory bowel disease by whole-genome sequencing identifies association at *ADCY7*." *Nat Genet* **49**(2): 186-192.
- Ma, J., Y. Meng, D. J. Kwiatkowski, X. Chen, H. Peng, Q. Sun, X. Zha, F. Wang, Y. Wang, Y. Jing, S. Zhang, R. Chen, L. Wang, E. Wu, G. Cai, I. Malinowska-Kolodziej, Q. Liao, Y. Liu, Y. Zhao, Q. Sun, K. Xu, J. Dai, J. Han, L. Wu, R. C. Zhao, H. Shen et H. Zhang (2010). "Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade." *J Clin Invest* **120**(1): 103-114.
- Ma, P. et R. M. Schultz (2016). "HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation embryos: Specificity versus compensation." *Cell Death Differ* **23**(7): 1119-1127.
- Ma, Q. (2013). "Role of *nrf2* in oxidative stress and toxicity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 401-426.
- Madison, B. B., L. Dunbar, X. T. Qiao, K. Braunstein, E. Braunstein et D. L. Gumucio (2002). "Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine." *J Biol Chem* **277**(36): 33275-33283.

- Maloy, K. J. et F. Powrie (2011). "Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease." *Nature* **474**(7351): 298-306.
- Malvaez, M., S. C. McQuown, G. A. Rogge, M. Astarabadi, V. Jacques, S. Carreiro, J. R. Rusche et M. A. Wood (2013). "HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(7): 2647-2652.
- Mann, M. (2006). "Functional and quantitative proteomics using SILAC." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(12): 952-958.
- Maynard, C. L., C. O. Elson, R. D. Hatton et C. T. Weaver (2012). "Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system." *Nature* **489**(7415): 231-241.
- McCracken, K. W., E. M. Cata, C. M. Crawford, K. L. Sinagoga, M. Schumacher, B. E. Rockich, Y. H. Tsai, C. N. Mayhew, J. R. Spence, Y. Zavros et J. M. Wells (2014). "Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids." *Nature* **516**(7531): 400-404.
- Mews, P., G. Donahue, A. M. Drake, V. Luczak, T. Abel et S. L. Berger (2017). "Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory." *Nature* **546**(7658): 381-386.
- Miller, K. M., J. V. Tjeertes, J. Coates, G. Legube, S. E. Polo, S. Britton et S. P. Jackson (2010). "Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining." *Nat Struct Mol Biol* **17**(9): 1144-1151.
- Miron, N. et V. Cristea (2012). "Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut." *Clin Exp Immunol* **167**(3): 405-412.
- Monteleone, I., F. Pallone et G. Monteleone (2013). "Aryl hydrocarbon receptor and colitis." *Semin Immunopathol* **35**(6): 671-675.
- Montgomery, R. K., D. L. Carlone, C. A. Richmond, L. Farilla, M. E. Kranendonk, D. E. Henderson, N. Y. Baffour-Awuah, D. M. Ambruzs, L. K. Fogli, S. Algra et D. T. Breault (2011). "Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(1): 179-184.
- Montgomery, R. L., C. A. Davis, M. J. Potthoff, M. Haberland, J. Fielitz, X. Qi, J. A. Hill, J. A. Richardson et E. N. Olson (2007). "Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility." *Genes Dev* **21**(14): 1790-1802.
- Moran-Ramos, S., A. R. Tovar et N. Torres (2012). "Diet: friend or foe of enteroendocrine cells--how it interacts with enteroendocrine cells." *Adv Nutr* **3**(1): 8-20.
- Moser, M. A., A. Hagelkruys et C. Seiser (2014). "Transcription and beyond: the role of mammalian class I lysine deacetylases." *Chromosoma* **123**(1-2): 67-78.
- Munoz, J., D. E. Stange, A. G. Schepers, M. van de Wetering, B. K. Koo, S. Itzkovitz, R. Volckmann, K. S. Kung, J. Koster, S. Radulescu, K. Myant, R. Versteeg, O. J. Sansom, J. H. van Es, N. Barker, A. van Oudenaarden, S. Mohammed, A. J. Heck et H. Clevers (2012). "The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers." *EMBO J* **31**(14): 3079-3091.
- Nadkarni, R. R., S. Abed et J. S. Draper (2016). "Organoids as a model system for studying human lung development and disease." *Biochem Biophys Res Commun* **473**(3): 675-682.
- Namdar, M., G. Perez, L. Ngo et P. A. Marks (2010). "Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(46): 20003-20008.

- Neal, M. D., C. P. Sodhi, H. Jia, M. Dyer, C. E. Egan, I. Yazji, M. Good, A. Afrazi, R. Marino, D. Slagle, C. Ma, M. F. Branca, T. Prindle, Jr., Z. Grant, J. Ozolek et D. J. Hackam (2012). "Toll-like receptor 4 is expressed on intestinal stem cells and regulates their proliferation and apoptosis via the p53 up-regulated modulator of apoptosis." *J Biol Chem* **287**(44): 37296-37308.
- Neufert, C., G. Pickert, Y. Zheng, N. Wittkopf, M. Warntjen, A. Nikolaev, W. Ouyang, M. F. Neurath et C. Becker (2010). "Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis." *Cell Cycle* **9**(4): 652-655.
- Newbold, A., K. J. Falkenberg, H. M. Prince et R. W. Johnstone (2016). "How do tumor cells respond to HDAC inhibition?" *FEBS J* **283**(22): 4032-4046.
- Newman, J. C. et E. Verdin (2014). "beta-hydroxybutyrate: much more than a metabolite." *Diabetes Res Clin Pract* **106**(2): 173-181.
- Nguyen, T., P. Nioi et C. B. Pickett (2009). "The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress." *J Biol Chem* **284**(20): 13291-13295.
- Nigro, G., R. Rossi, P. H. Commere, P. Jay et P. J. Sansonetti (2014). "The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration." *Cell Host Microbe* **15**(6): 792-798.
- Noah, T. K. et N. F. Shroyer (2013). "Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis." *Annu Rev Physiol* **75**: 263-288.
- Oehme, I., H. E. Deubzer, D. Wegener, D. Pickert, J. P. Linke, B. Hero, A. Kopp-Schneider, F. Westermann, S. M. Ulrich, A. von Deimling, M. Fischer et O. Witt (2009). "Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis." *Clin Cancer Res* **15**(1): 91-99.
- Oh, W. J. et E. Jacinto (2011). "mTOR complex 2 signaling and functions." *Cell Cycle* **10**(14): 2305-2316.
- Oiso, H., N. Furukawa, M. Suefuji, S. Shimoda, A. Ito, R. Furumai, J. Nakagawa, M. Yoshida, N. Nishino et E. Araki (2011). "The role of class I histone deacetylase (HDAC) on gluconeogenesis in liver." *Biochem Biophys Res Commun* **404**(1): 166-172.
- Okamoto, R., K. Tsuchiya, Y. Nemoto, J. Akiyama, T. Nakamura, T. Kanai et M. Watanabe (2009). "Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(1): G23-35.
- Olzscha, H., S. Sheikh et N. B. La Thangue (2015). "Deacetylation of chromatin and gene expression regulation: a new target for epigenetic therapy." *Crit Rev Oncog* **20**(1-2): 1-17.
- Ootani, A., X. Li, E. Sangiorgi, Q. T. Ho, H. Ueno, S. Toda, H. Sugihara, K. Fujimoto, I. L. Weissman, M. R. Capecchi et C. J. Kuo (2009). "Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche." *Nat Med* **15**(6): 701-706.
- Palermo, R., S. Checquolo, A. Giovenco, P. Grazioli, V. Kumar, A. F. Campese, A. Giorgi, M. Napolitano, G. Canettieri, G. Ferrara, M. E. Schinina, M. Maroder, L. Frati, A. Gulino, A. Vacca et I. Screpanti (2012). "Acetylation controls Notch3 stability and function in T-cell leukemia." *Oncogene* **31**(33): 3807-3817.
- Park, J., M. Kim, S. G. Kang, A. H. Jannasch, B. Cooper, J. Patterson et C. H. Kim (2015). "Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway." *Mucosal Immunol* **8**(1): 80-93.

- Parker, A., O. J. Maclaren, A. G. Fletcher, D. Muraro, P. A. Kreuzaler, H. M. Byrne, P. K. Maini, A. J. Watson et C. Pin (2017). "Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi." *FASEB J* **31**(2): 636-649.
- Patel, J., R. R. Pathak et S. Mujtaba (2011). "The biology of lysine acetylation integrates transcriptional programming and metabolism." *Nutr Metab (Lond)* **8**: 12.
- Peterson, L. W. et D. Artis (2014). "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." *Nat Rev Immunol* **14**(3): 141-153.
- Pietrocola, F., L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, F. Madeo et G. Kroemer (2015). "Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger." *Cell Metab* **21**(6): 805-821.
- Podolsky, D. K., G. Gerken, A. Eyking et E. Cario (2009). "Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency." *Gastroenterology* **137**(1): 209-220.
- Powell, A. E., Y. Wang, Y. Li, E. J. Poulin, A. L. Means, M. K. Washington, J. N. Higginbotham, A. Juchheim, N. Prasad, S. E. Levy, Y. Guo, Y. Shyr, B. J. Aronow, K. M. Haigis, J. L. Franklin et R. J. Coffey (2012). "The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor." *Cell* **149**(1): 146-158.
- Proud, C. G. (2009). "mTORC1 signalling and mRNA translation." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 227-231.
- Qin, H. T., H. Q. Li et F. Liu (2017). "Selective histone deacetylase small molecule inhibitors: recent progress and perspectives." *Expert Opin Ther Pat* **27**(5): 621-636.
- Qiu, Z., J. L. Cervantes, B. B. Cicek, S. Mukherjee, M. Venkatesh, L. A. Maher, J. C. Salazar, S. Mani et K. M. Khanna (2016). "Pregnane X Receptor Regulates Pathogen-Induced Inflammation and Host Defense against an Intracellular Bacterial Infection through Toll-like Receptor 4." *Sci Rep* **6**: 31936.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg et R. Medzhitov (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-241.
- Rando, O. J. (2012). "Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code." *Curr Opin Genet Dev* **22**(2): 148-155.
- Rapozo, D. C., C. Bernardazzi et H. S. de Souza (2017). "Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony." *World J Gastroenterol* **23**(12): 2124-2140.
- Redon, C. E., U. Weyemi, P. R. Parekh, D. Huang, A. S. Burrell et W. M. Bonner (2012). "gamma-H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic." *Biochim Biophys Acta* **1819**(7): 743-756.
- Reed, S. M. et D. E. Quelle (2014). "p53 Acetylation: Regulation and Consequences." *Cancers (Basel)* **7**(1): 30-69.
- Renz, H., P. Brandtzaeg et M. Hornef (2011). "The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation." *Nat Rev Immunol* **12**(1): 9-23.
- Robert, T., F. Vanoli, I. Chiolo, G. Shubassi, K. A. Bernstein, R. Rothstein, O. A. Botrugno, D. Parazzoli, A. Oldani, S. Minucci et M. Foiani (2011). "HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy." *Nature* **471**(7336): 74-79.

- Rodriguez-Colman, M. J., M. Schewe, M. Meerlo, E. Stigter, J. Gerrits, M. Pras-Raves, A. Sacchetti, M. Hornsveld, K. C. Oost, H. J. Snippert, N. Verhoeven-Duif, R. Fodde et B. M. Burgering (2017). "Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function." *Nature* **543**(7645): 424-427.
- Sailaja, B. S., X. C. He et L. Li (2016). "The regulatory niche of intestinal stem cells." *J Physiol* **594**(17): 4827-4836.
- Sakaguchi, K., J. E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C. W. Anderson et E. Appella (1998). "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." *Genes Dev* **12**(18): 2831-2841.
- Sampson, L. L., A. K. Davis, M. W. Grogg et Y. Zheng (2016). "mTOR disruption causes intestinal epithelial cell defects and intestinal atrophy postinjury in mice." *FASEB J* **30**(3): 1263-1275.
- San Roman, A. K., C. D. Jayewickreme, L. C. Murtaugh et R. A. Shivdasani (2014). "Wnt secretion from epithelial cells and subepithelial myofibroblasts is not required in the mouse intestinal stem cell niche in vivo." *Stem Cell Reports* **2**(2): 127-134.
- Sanchez, R. et M. M. Zhou (2009). "The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription." *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**(5): 659-665.
- Sancho, R., C. A. Cremona et A. Behrens (2015). "Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease." *EMBO Rep* **16**(5): 571-581.
- Sandborn, W. J., C. Su, B. E. Sands, G. R. D'Haens, S. Vermeire, S. Schreiber, S. Danese, B. G. Feagan, W. Reinisch, W. Niezychowski, G. Friedman, N. Lawendy, D. Yu, D. Woodworth, A. Mukherjee, H. Zhang, P. Healey, J. Panes, O. I. Octave Induction et O. S. Investigators (2017). "Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis." *N Engl J Med* **376**(18): 1723-1736.
- Sangiorgi, E. et M. R. Capecchi (2008). "Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells." *Nat Genet* **40**(7): 915-920.
- Sato, T., D. E. Stange, M. Ferrante, R. G. Vries, J. H. Van Es, S. Van den Brink, W. J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P. D. Siersema et H. Clevers (2011). "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium." *Gastroenterology* **141**(5): 1762-1772.
- Sato, T., J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N. F. Shroyer, M. van de Wetering et H. Clevers (2011). "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts." *Nature* **469**(7330): 415-418.
- Sato, T., R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters et H. Clevers (2009). "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche." *Nature* **459**(7244): 262-265.
- Seto, E. et M. Yoshida (2014). "Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**(4): a018713.
- Shaw, P. J., M. Lamkanfi et T. D. Kanneganti (2010). "NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome." *Eur J Immunol* **40**(3): 624-627.
- Sheynkman, G. M., M. R. Shortreed, B. L. Frey, M. Scalf et L. M. Smith (2014). "Large-scale mass spectrometric detection of variant peptides resulting from nonsynonymous nucleotide differences." *J Proteome Res* **13**(1): 228-240.
- Shimazu, T., M. D. Hirschey, J. Newman, W. He, K. Shirakawa, N. Le Moan, C. A. Grueter, H. Lim, L. R. Saunders, R. D. Stevens, C. B. Newgard, R. V. Farese, Jr., R. de

- Cabo, S. Ulrich, K. Akassoglou et E. Verdin (2013). "Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor." *Science* **339**(6116): 211-214.
- Shore, D. (2000). "The Sir2 protein family: A novel deacetylase for gene silencing and more." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14030-14032.
- Simon, G. M., J. Cheng et J. I. Gordon (2012). "Quantitative assessment of the impact of the gut microbiota on lysine epsilon-acetylation of host proteins using gnotobiotic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(28): 11133-11138.
- Singh, J. A., K. G. Saag, S. L. Bridges, Jr., E. A. Akl, R. R. Bannuru, M. C. Sullivan, E. Vaysbrot, C. McNaughton, M. Osani, R. H. Shmerling, J. R. Curtis, D. E. Furst, D. Parks, A. Kavanaugh, J. O'Dell, C. King, A. Leong, E. L. Matteson, J. T. Schousboe, B. Drevlow, S. Ginsberg, J. Grober, E. W. St Clair, E. Tindall, A. S. Miller et T. McAlindon (2016). "2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis." *Arthritis Rheumatol* **68**(1): 1-26.
- Singh, N. P., U. P. Singh, B. Singh, R. L. Price, M. Nagarkatti et P. S. Nagarkatti (2011). "Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis." *PLoS One* **6**(8): e23522.
- Skoczek, D. A., P. Walczysko, N. Horn, A. Parris, S. Clare, M. R. Williams et A. Sobolewski (2014). "Luminal microbes promote monocyte-stem cell interactions across a healthy colonic epithelium." *J Immunol* **193**(1): 439-451.
- Smolle, M. et J. L. Workman (2013). "Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription." *Biochim Biophys Acta* **1829**(1): 84-97.
- Song, J., J. H. Noh, J. H. Lee, J. W. Eun, Y. M. Ahn, S. Y. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, N. J. Yoo, J. Y. Lee et S. W. Nam (2005). "Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer." *APMIS* **113**(4): 264-268.
- Spiegel, S., S. Milstien et S. Grant (2012). "Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy." *Oncogene* **31**(5): 537-551.
- Sudo, T., K. Mimori, N. Nishida, R. Kogo, T. Iwaya, F. Tanaka, K. Shibata, H. Fujita, K. Shirouzu et M. Mori (2011). "Histone deacetylase 1 expression in gastric cancer." *Oncol Rep* **26**(4): 777-782.
- Sun, G., L. V. Mackey, D. H. Coy, C. Y. Yu et L. Sun (2015). "The Histone Deacetylase Inhibitor Vaproic Acid Induces Cell Growth Arrest in Hepatocellular Carcinoma Cells via Suppressing Notch Signaling." *J Cancer* **6**(10): 996-1004.
- Suo, H., P. Wang, J. Tong, L. Cai, J. Liu, D. Huang, L. Huang, Z. Wang, Y. Huang, J. Xu, Y. Ma, M. Yu, J. Fei et F. Huang (2015). "NRSF is an essential mediator for the neuroprotection of trichostatin A in the MPTP mouse model of Parkinson's disease." *Neuropharmacology* **99**: 67-78.
- Sutendra, G., A. Kinnaird, P. Dromparis, R. Paulin, T. H. Stenson, A. Haromy, K. Hashimoto, N. Zhang, E. Flaim et E. D. Michelakis (2014). "A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation." *Cell* **158**(1): 84-97.
- Tadesse, S., G. Corner, E. Dhima, M. Houston, C. Guha, L. Augenlicht et A. Velcich (2017). "MUC2 mucin deficiency alters inflammatory and metabolic pathways in the mouse intestinal mucosa." *Oncotarget*.

- Takeda, N., R. Jain, M. R. LeBoeuf, Q. Wang, M. M. Lu et J. A. Epstein (2011). "Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches." *Science* **334**(6061): 1420-1424.
- Tan, M., H. Luo, S. Lee, F. Jin, J. S. Yang, E. Montellier, T. Buchou, Z. Cheng, S. Rousseaux, N. Rajagopal, Z. Lu, Z. Ye, Q. Zhu, J. Wysocka, Y. Ye, S. Khochbin, B. Ren et Y. Zhao (2011). "Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification." *Cell* **146**(6): 1016-1028.
- Tang, J., H. Yan et S. Zhuang (2013). "Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases." *Clin Sci (Lond)* **124**(11): 651-662.
- Tanoue, T. et K. Honda (2012). "Induction of Treg cells in the mouse colonic mucosa: a central mechanism to maintain host-microbiota homeostasis." *Semin Immunol* **24**(1): 50-57.
- Tao, R., E. F. de Zoeten, E. Ozkaynak, C. Chen, L. Wang, P. M. Porrett, B. Li, L. A. Turka, E. N. Olson, M. I. Greene, A. D. Wells et W. W. Hancock (2007). "Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells." *Nat Med* **13**(11): 1299-1307.
- Taube, C., C. Tertilt, G. Gyulveszi, N. Dehzad, K. Kreymborg, K. Schneeweiss, E. Michel, S. Reuter, J. C. Renauld, D. Arnold-Schild, H. Schild, R. Buhl et B. Becher (2011). "IL-22 is produced by innate lymphoid cells and limits inflammation in allergic airway disease." *PLoS One* **6**(7): e21799.
- Tetteh, P. W., H. F. Farin et H. Clevers (2015). "Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia." *Trends Cell Biol* **25**(2): 100-108.
- Tian, J., Y. Feng, H. Fu, H. Q. Xie, J. X. Jiang et B. Zhao (2015). "The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals." *Environ Sci Technol* **49**(16): 9518-9531.
- Turgeon, N., M. Blais, J. F. Delabre et C. Asselin (2013). "The histone H3K27 methylation mark regulates intestinal epithelial cell density-dependent proliferation and the inflammatory response." *J Cell Biochem* **114**(5): 1203-1215.
- Turgeon, N., M. Blais, J. M. Gagne, V. Tardif, F. Boudreau, N. Perreault et C. Asselin (2013). "HDAC1 and HDAC2 restrain the intestinal inflammatory response by regulating intestinal epithelial cell differentiation." *PLoS One* **8**(9): e73785.
- Turgeon, N., J. M. Gagne, M. Blais, F. P. Gendron, F. Boudreau et C. Asselin (2014). "The acetylome regulators Hdac1 and Hdac2 differently modulate intestinal epithelial cell dependent homeostatic responses in experimental colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **306**(7): G594-605.
- Turgeon, N., C. Valiquette, M. Blais, S. Routhier, E. G. Seidman et C. Asselin (2008). "Regulation of C/EBPdelta-dependent transactivation by histone deacetylases in intestinal epithelial cells." *J Cell Biochem* **103**(5): 1573-1583.
- Turner, J. R. (2009). "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." *Nat Rev Immunol* **9**(11): 799-809.
- Vaishnava, S., M. Yamamoto, K. M. Severson, K. A. Ruhn, X. Yu, O. Koren, R. Ley, E. K. Wakeland et L. V. Hooper (2011). "The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine." *Science* **334**(6053): 255-258.
- Valenta, T., B. Degirmenci, A. E. Moor, P. Herr, D. Zimmerli, M. B. Moor, G. Hausmann, C. Cantu, M. Aguet et K. Basler (2016). "Wnt Ligands Secreted by Subepithelial

Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis." *Cell Rep* **15**(5): 911-918.

van Beelen Granlund, A., A. E. Ostvik, O. Brenna, S. H. Torp, B. I. Gustafsson et A. K. Sandvik (2013). "REG gene expression in inflamed and healthy colon mucosa explored by in situ hybridisation." *Cell Tissue Res* **352**(3): 639-646.

van de Wetering, M., H. E. Francies, J. M. Francis, G. Bounova, F. Iorio, A. Pronk, W. van Houdt, J. van Gorp, A. Taylor-Weiner, L. Kester, A. McLaren-Douglas, J. Blokker, S. Jaksani, S. Bartfeld, R. Volckman, P. van Sluis, V. S. Li, S. Seepo, C. Sekhar Pedamallu, K. Cibulskis, S. L. Carter, A. McKenna, M. S. Lawrence, L. Lichtenstein, C. Stewart, J. Koster, R. Versteeg, A. van Oudenaarden, J. Saez-Rodriguez, R. G. Vries, G. Getz, L. Wessels, M. R. Stratton, U. McDermott, M. Meyerson, M. J. Garnett et H. Clevers (2015). "Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients." *Cell* **161**(4): 933-945.

van der Flier, L. G., A. Haegebarth, D. E. Stange, M. van de Wetering et H. Clevers (2009). "OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells." *Gastroenterology* **137**(1): 15-17.

van der Flier, L. G., M. E. van Gijn, P. Hatzis, P. Kujala, A. Haegebarth, D. E. Stange, H. Begthel, M. van den Born, V. Guryev, I. Oving, J. H. van Es, N. Barker, P. J. Peters, M. van de Wetering et H. Clevers (2009). "Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate." *Cell* **136**(5): 903-912.

Van der Sluis, M., B. A. De Koning, A. C. De Bruijn, A. Velcich, J. P. Meijerink, J. B. Van Goudoever, H. A. Buller, J. Dekker, I. Van Seuning, I. B. Renes et A. W. Einerhand (2006). "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection." *Gastroenterology* **131**(1): 117-129.

van Es, J. H., N. de Geest, M. van de Born, H. Clevers et B. A. Hassan (2010). "Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors." *Nat Commun* **1**: 18.

van Es, J. H., T. Sato, M. van de Wetering, A. Lyubimova, A. N. Nee, A. Gregorieff, N. Sasaki, L. Zeinstra, M. van den Born, J. Korving, A. C. Martens, N. Barker, A. van Oudenaarden et H. Clevers (2012). "Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage." *Nat Cell Biol* **14**(10): 1099-1104.

Ventham, N. T., N. A. Kennedy, E. R. Nimmo et J. Satsangi (2013). "Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics." *Gastroenterology* **145**(2): 293-308.

Ververis, K., A. Hiong, T. C. Karagiannis et P. V. Licciardi (2013). "Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents." *Biologics* **7**: 47-60.

Wagner, F. F., U. M. Wesmall yi, M. C. Lewis et E. B. Holson (2013). "Small molecule inhibitors of zinc-dependent histone deacetylases." *Neurotherapeutics* **10**(4): 589-604.

Wang, G. L., E. Salisbury, X. Shi, L. Timchenko, E. E. Medrano et N. A. Timchenko (2008). "HDAC1 promotes liver proliferation in young mice via interactions with C/EBPbeta." *J Biol Chem* **283**(38): 26179-26187.

Wang, H., F. Lafdil, X. Kong et B. Gao (2011). "Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target." *Int J Biol Sci* **7**(5): 536-550.

Wang, X. et C. G. Proud (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis." *Physiology (Bethesda)* **21**: 362-369.

- Watanabe, T., N. Asano, P. J. Murray, K. Ozato, P. Taylor, I. J. Fuss, A. Kitani et W. Strober (2008). "Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis." *J Clin Invest* **118**(2): 545-559.
- Weaver, C. T., C. O. Elson, L. A. Fouser et J. K. Kolls (2013). "The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin." *Annu Rev Pathol* **8**: 477-512.
- Wellen, K. E., G. Hatzivassiliou, U. M. Sachdeva, T. V. Bui, J. R. Cross et C. B. Thompson (2009). "ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation." *Science* **324**(5930): 1076-1080.
- Wellen, K. E. et C. B. Thompson (2012). "A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(4): 270-276.
- Wilson, A. J., D. S. Byun, N. Popova, L. B. Murray, K. L'Italien, Y. Sowa, D. Arango, A. Velcich, L. H. Augenlicht et J. M. Mariadason (2006). "Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer." *J Biol Chem* **281**(19): 13548-13558.
- Winter, M., M. A. Moser, D. Meunier, C. Fischer, G. Machat, K. Mattes, B. M. Lichtenberger, R. Brunmeir, S. Weissmann, C. Murko, C. Humer, T. Meischel, G. Brosch, P. Matthias, M. Sibilica et C. Seiser (2013). "Divergent roles of HDAC1 and HDAC2 in the regulation of epidermal development and tumorigenesis." *EMBO J* **32**(24): 3176-3191.
- Witt, O., H. E. Deubzer, T. Milde et I. Oehme (2009). "HDAC family: What are the cancer relevant targets?" *Cancer Lett* **277**(1): 8-21.
- Wittkopf, N., G. Pickert, U. Billmeier, M. Mahapatro, S. Wirtz, E. Martini, M. Leppkes, M. F. Neurath et C. Becker (2015). "Activation of intestinal epithelial Stat3 orchestrates tissue defense during gastrointestinal infection." *PLoS One* **10**(3): e0118401.
- Yamaguchi, T., F. Cubizolles, Y. Zhang, N. Reichert, H. Kohler, C. Seiser et P. Matthias (2010). "Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression." *Genes Dev* **24**(5): 455-469.
- Yang, H., B. Yan, D. Liao, S. Huang et Y. Qiu (2015). "Acetylation of HDAC1 and degradation of SIRT1 form a positive feedback loop to regulate p53 acetylation during heat-shock stress." *Cell Death Dis* **6**: e1747.
- Yang, X. J. et E. Seto (2008). "The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 206-218.
- Yin, H., X. Li, B. Zhang, T. Liu, B. Yuan, Q. Ni, S. Hu et H. Gu (2013). "Sirolimus ameliorates inflammatory responses by switching the regulatory T/T helper type 17 profile in murine colitis." *Immunology* **139**(4): 494-502.
- Yin, X., H. F. Farin, J. H. van Es, H. Clevers, R. Langer et J. M. Karp (2014). "Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny." *Nat Methods* **11**(1): 106-112.
- Yuan, Z. L., Y. J. Guan, D. Chatterjee et Y. E. Chin (2005). "Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue." *Science* **307**(5707): 269-273.
- Zhang, H., K. J. A. Davies et H. J. Forman (2015). "Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging." *Free Radic Biol Med* **88**(Pt B): 314-336.
- Zhang, J. et Q. Zhong (2014). "Histone deacetylase inhibitors and cell death." *Cell Mol Life Sci* **71**(20): 3885-3901.
- Zhang, T., S. Cooper et N. Brockdorff (2015). "The interplay of histone modifications - writers that read." *EMBO Rep* **16**(11): 1467-1481.

- Zhang, Z., H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, Y. Hara, S. Kobayashi et H. Iwase (2005). "Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*." *Breast Cancer Res Treat* **94**(1): 11-16.
- Zhao, S., A. Torres, R. A. Henry, S. Trefely, M. Wallace, J. V. Lee, A. Carrer, A. Sengupta, S. L. Campbell, Y. M. Kuo, A. J. Frey, N. Meurs, J. M. Viola, I. A. Blair, A. M. Weljie, C. M. Metallo, N. W. Snyder, A. J. Andrews et K. E. Wellen (2016). "ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch." *Cell Rep* **17**(4): 1037-1052.
- Zheng, X., K. Tsuchiya, R. Okamoto, M. Iwasaki, Y. Kano, N. Sakamoto, T. Nakamura et M. Watanabe (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**(11): 2251-2260.
- Zheng, Y., P. M. Thomas et N. L. Kelleher (2013). "Measurement of acetylation turnover at distinct lysines in human histones identifies long-lived acetylation sites." *Nat Commun* **4**: 2203.
- Zhou, V. W., A. Goren et B. E. Bernstein (2011). "Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes." *Nat Rev Genet* **12**(1): 7-18.
- Zhou, Y., P. Rychahou, Q. Wang, H. L. Weiss et B. M. Evers (2015). "TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium." *Cell Death Dis* **6**: e1631.
- Zhou, Y., Q. Wang, H. L. Weiss et B. M. Evers (2014). "Nuclear factor of activated T-cells 5 increases intestinal goblet cell differentiation through an mTOR/Notch signaling pathway." *Mol Biol Cell* **25**(18): 2882-2890.
- Zhu, P., E. Martin, J. Mengwasser, P. Schlag, K. P. Janssen et M. Gottlicher (2004). "Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis." *Cancer Cell* **5**(5): 455-463.
- Zhu, Q., G. Kong, Z. Huang, W. Ji, X. Wang, J. Liu, X. Wu, Z. Huang et R. Li (2017). "The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate attenuates oxidative stress in spinal cord injury by suppression of class I histone deacetylases." *J Neurotrauma*.
- Zimberlin, C. D., C. Lancini, R. Sno, S. L. Rosekrans, C. M. McLean, H. Vlaming, G. R. van den Brink, M. Bots, J. P. Medema et J. H. Dannenberg (2015). "HDAC1 and HDAC2 collectively regulate intestinal stem cell homeostasis." *FASEB J* **29**(5): 2070-2080.

ANNEXES

22/08/2017

RightsLink Printable License

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 22, 2017

This Agreement between Alexis Gonneaud ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|---|
| License Number | 4174260283902 |
| License date | Aug 22, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed Content Publication | Nature Reviews Molecular Cell Biology |
| Licensed Content Title | Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments |
| Licensed Content Author | Margaret A. Goodell, Hoang Nguyen, Noah Shroyer |
| Licensed Content Date | Apr 23, 2015 |
| Licensed Content Volume | 16 |
| Licensed Content Issue | 5 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Figures | Figure 3 |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | |
| Title of your thesis / dissertation | HDAC1 et HDAC2, des rôles redondants et distincts dans la régulation de l'homéostasie intestinale |
| Expected completion date | Dec 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 150 |
| Requestor Location | Alexis Gonneaud Department of Anatomy and Cell Biology Faculty of Medicine and Health Sciences 3201 rue Jean-Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Alexis Gonneaud |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | Alexis Gonneaud Department of Anatomy and Cell Biology Faculty of Medicine and Health Sciences 3201 rue Jean-Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Alexis Gonneaud |
| Total | 0.00 CAD |
| Terms and Conditions | |

22/08/2017

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Account
Info

Help



Title: Mini-Gut Organoids:
Reconstitution of the Stem Cell
Niche

Author: Shoichi Date, Toshiro Sato

Publication: Annual Review of Cell and
Developmental Biology

Publisher: Annual Reviews

Date: Nov 13, 2015

Copyright © 2015, Annual Reviews

Logged in as:
Alexis Gonneaud
Account #:
3000801835

LOGOUT

Permission Not Required

Material may be republished in a thesis / dissertation without obtaining additional permission from Annual Reviews, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2017 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 22, 2017

This Agreement between Alexis Gonneaud ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|---|
| License Number | 4174260873587 |
| License date | Aug 22, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed Content Publication | Nature |
| Licensed Content Title | Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease |
| Licensed Content Author | Bernard Khor, Agnès Gardet, Ramnik J. Xavier |
| Licensed Content Date | Jun 15, 2011 |
| Licensed Content Volume | 474 |
| Licensed Content Issue | 7351 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Figures | Figure 2 |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | |
| Title of your thesis / dissertation | HDAC1 et HDAC2, des rôles redondants et distincts dans la régulation de l'homéostasie intestinale |
| Expected completion date | Dec 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 150 |
| Requestor Location | Alexis Gonneaud Department of Anatomy and Cell Biology Faculty of Medicine and Health Sciences 3201 rue Jean-Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Alexis Gonneaud |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | Alexis Gonneaud Department of Anatomy and Cell Biology Faculty of Medicine and Health Sciences 3201 rue Jean-Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Alexis Gonneaud |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 22, 2017

This Agreement between Alexis Gonneaud ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|---|
| License Number | 4174261006459 |
| License date | Aug 22, 2017 |
| Licensed Content Publisher | Nature Publishing Group |
| Licensed Content Publication | Nature Reviews Drug Discovery |
| Licensed Content Title | Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders |
| Licensed Content Author | Katrina J. Falkenberg, Ricky W. Johnstone |
| Licensed Content Date | Aug 18, 2014 |
| Licensed Content Volume | 13 |
| Licensed Content Issue | 9 |
| Type of Use | reuse in a dissertation / thesis |
| Requestor type | academic/educational |
| Format | electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Figures | Figure 1 |
| Author of this NPG article | no |
| Your reference number | |
| Title of your thesis / dissertation | HDAC1 et HDAC2, des rôles redondants et distincts dans la régulation de l'homéostasie intestinale |
| Expected completion date | Dec 2017 |
| Estimated size (number of pages) | 150 |
| Requestor Location | Alexis Gonneaud Department of Anatomy and Cell Biology Faculty of Medicine and Health Sciences 3201 rue Jean-Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Alexis Gonneaud |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | Alexis Gonneaud Department of Anatomy and Cell Biology Faculty of Medicine and Health Sciences 3201 rue Jean-Mignault Sherbrooke, QC J1E 4K8 Canada Attn: Alexis Gonneaud |
| Total | 0.00 USD |
| Terms and Conditions | |