



HAL
open science

Etude des mécanismes impliqués dans le contrôle du destin des cellules souches intestinales et développement d'un modèle 3D d'épithélium intestinal

Justine Creff

► **To cite this version:**

Justine Creff. Etude des mécanismes impliqués dans le contrôle du destin des cellules souches intestinales et développement d'un modèle 3D d'épithélium intestinal. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier), 2019. Français. NNT: . tel-02468021

HAL Id: tel-02468021

<https://laas.hal.science/tel-02468021v1>

Submitted on 5 Feb 2020

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Justine CREFF

Le 12 décembre 2019

**Etude des mécanismes impliqués dans le contrôle du destin des cellules
souches intestinales et développement d'un modèle 3D d'épithélium
intestinal**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :

LBCMCP - Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération

Thèse dirigée par

Arnaud BESSON et Laurent MALAQUIN

Jury

M. Frédéric Relaix, Rapporteur

M. Philippe Jay, Rapporteur

M. Christophe Marquette, Rapporteur

Mme Anastassia Hatzoglou, Présidente

M. Arnaud BESSON, Directeur de thèse

M. Laurent Malaquin, Co-directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : Le Dr. Anastassia Hatzoglou d'avoir accepté de présider ce jury, le Dr. Frédéric Relaix, le Dr. Philippe Jay et le Dr. Christophe Marquette, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Merci pour le temps qu'ils ont consacré et pour les retours, leurs conseils et les discussions très enrichissantes au cours de la soutenance.

Je souhaite dans un premier temps remercier mes directeurs de thèse Arnaud Besson et Laurent Malaquin pour la confiance qu'ils m'ont accordés et l'opportunité qu'ils m'ont donné de réaliser cette thèse. Un grand merci pour votre soutien et vos conseils tant scientifiques que personnels, pour votre implication, votre présence mais aussi l'autonomie que vous m'avez accordée tout au long de ces 4 années qui ont été pour moi indispensable et source de motivation !

Un grand merci également à tous les membres de l'équipe Besson (actuels et passés) : Christine, Anastassia, Maëlle, Raphael. Mes collègues thésards Renaud, Ada et Pauline pour le soutien, les discussions pendant les pauses cafés, les soirées et surtout la bonne humeur.

Merci à tous les membres de l'équipe Elia : Emanuelle, les Christophes, Etienne, Aline... pour leur accueil, leur bonne humeur et leurs conseils tout au long de ma thèse. Un grand merci à tous les doctorants, post-doc, ingénieurs... de cette équipe que j'ai croisés : Emma, Aurore, Louisa, Charline, Elise, Roberto, Kayum, Emma, Dimitri, Elise... un grand merci à tous pour les pauses cafés, le soutien, et les échanges que vous m'avez apportés. Julie, un grand merci à toi pour ce que tu m'as apporté sur le plan personnel et professionnel, pour ta confiance, ton soutien et surtout tes encouragements !

Un immense merci à Rémi pour toute l'aide que tu m'as apporté, pour ton implication, ton soutien, ta bonne humeur et ta bienveillance. J'ai eu énormément de plaisir à travailler avec toi et j'espère que'on va continuer à développer ce projet ensemble ;)

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail grâce à leur conseil, et leur aide précieuse : Thomas Mangeat, Thomas Jungas, Brice ...

Merci à l'équipe Manenti pour leur accueil, avec une mention particulière pour Laurent avec qui j'ai eu plaisir de partager ces deux années. A Mathilde (ma grande copine), Isa (toujours de bonne humeur, merci pour toutes ces discussions rpm), Maëlle (ta gentillesse, ton écoute et

ton soutien) et Laure (ta bonne humeur communicative à tout épreuve), anciennes collègues mais surtout devenues de très bons amis.

A tous mes amis pour tout ce qu'ils m'ont apporté, merci pour votre amitié sincère et partagée, pour votre soutien indéfectible, pour votre présence, et pour tous ces moments inoubliables passés à vos côtés et pour tous ceux à venir : les toulousains : Christelle, Lise, Yohan, Laetitia, Céline, Martial, Pauline, Dorian, Romain, Christophe, Victor, Emma, Milou, Maud, Mélanie...

Pour finir je tiens à remercier toute ma famille, un grand merci à mes parents qui ont toujours cru en moi, qui m'ont poussé à avancer et m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui. Merci à mon frère Bastien et à toute la famille.

Résumé des travaux

L'épithélium intestinal est un tissu complexe, hautement polarisé, organisé sous forme de cryptes et villosités. Les cellules souches intestinales résident au fond des cryptes où elles prolifèrent et se différencient tout en migrant vers le haut des villosités, ce qui permet le renouvellement constant de l'épithélium tous les 3 à 5 jours. La maintenance de l'équilibre entre prolifération et différenciation est cruciale pour le développement et le maintien de l'intégrité tissulaire. Cet équilibre est supporté par le microenvironnement et l'organisation caractéristique de l'épithélium qui permet la compartimentation et la protection des cellules souches. Des altérations de ces dernières sont à l'origine d'anomalies du développement ainsi que de la transformation tumorale. L'étude des mécanismes impliqués dans la maintenance et dans la différenciation des cellules souches est donc essentielle pour mieux comprendre l'homéostasie tissulaire.

p57/Kip2 est un inhibiteur de cycline/CDK et un potentiel suppresseur de tumeur. p57 est également le gène le plus fréquemment muté ou réprimé dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), caractérisé par des anomalies du développement et une prédisposition tumorale durant l'enfance. La génération d'un modèle de souris knock-in (p57^{CK-}) dans lequel p57 ne lie plus les complexes cycline/CDK, a révélé que BWS résulte en partie de la perte de fonctions indépendantes des CDK de p57. Cette étude a également permis de mettre en évidence le rôle essentiel joué par p57 dans le développement intestinal, de manière indépendante de l'inhibition des CDK.

Le premier objectif de ce projet de thèse a été d'étudier le rôle de p57 dans la maintenance des cellules souches intestinales. Deux types de cellules souches intestinales ont été décrites jusqu'à présent, les cellules souches prolifératives CBC, responsables du renouvellement constant de l'épithélium et les cellules souches +4 dites de réserve, mobilisées en cas de dommages afin de régénérer le tissu. J'ai pu mettre en évidence que p57 est impliqué dans la maintenance des cellules souches +4 de manière indépendante de l'inhibition des CDK. Les souris p57^{KO} présentent une augmentation de la prolifération dans les cryptes due à une amplification des cellules progénitrices et de ces cellules souches de réserve +4, alors que les CBC ne sont pas affectées. J'ai également étudié le mécanisme moléculaire par lequel p57 contrôle la prolifération des cellules de la crypte et identifié Ascl2, un facteur de transcription clé dans le maintien des cellules souches, comme nouveau partenaire de p57. Mes données montrent que p57 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'Ascl2, via la formation d'un complexe co-répresseur avec HDAC7 et mSin3a. Ainsi ces travaux ont permis d'identifier une nouvelle fonction de p57 dans les cellules souches intestinales au cours du développement et pourrait expliquer le rôle de p57 dans la tumorigénèse intestinale.

Le deuxième objectif de mon projet de thèse a été de développer un nouveau modèle de culture pour l'étude des cellules souches intestinales. En effet, à l'heure actuelle, les études *in vitro* sont limitées à des modèles 2D ou des systèmes 3D de types organoïdes qui ne récapitulent pas complètement l'architecture 3D, le microenvironnement et la compartimentalisation présente au sein du tissu *in vivo*. Dans un premier temps, j'ai développé un nouvel hydrogel photopolymérisable compatible avec la culture de lignées cancéreuses colorectales. Ce matériau a ensuite été mis en forme par impression 3D haute résolution afin de fabriquer des

supports de culture mimant l'architecture tissulaire l'intestin. Enfin, j'ai pu montrer que ces modèles 3D permettent la croissance des cellules colorectales Caco-2 pendant au moins trois semaines, et que la culture en trois dimensions favorise leur polarisation. Ces modèles 3D pourraient donc constituer une approche alternative aux modèles *in vitro* actuellement disponible afin d'étudier les mécanismes gouvernant l'homéostasie tissulaire.

Abstract

The small intestine is a complex tissue with a crypt/villus architecture and high tissue polarity. Intestinal stem cells are located at the crypt bottom where they proliferate and differentiate while they migrate upward to the top of villi, allowing the constant renewal of the entire intestinal epithelium every 3 to 5 days. Compartmentalization in the crypt plays a key role in stem cell protection and maintenance, and this is supported by the microenvironment and tissue organization. The balance between stem cell proliferation and differentiation is necessary to maintain tissue integrity, and disruption of this balance leads to developmental anomalies and malignant transformation. Studying the mechanisms governing intestinal stem cells maintenance is therefore crucial to understand tissue homeostasis.

p57^{Kip2} is a cyclin/CDKs inhibitor and a putative tumor suppressor. p57 is also the gene the most frequently mutated or silenced in Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS), characterized by multiple developmental defects and tumor predisposition during childhood. Generation of knock-in mice expressing a mutant p57 (p57^{CK-}) that cannot bind to cyclins and CDKs demonstrated that p57 exerts CDKs independent functions during development and that BWS is not entirely caused by loss of CDKs inhibition due to p57 inactivation.

The first aim of this project was to investigate the role of p57 in the maintenance of intestinal stem cells. Two population of stem cells have been described in the intestine: proliferative crypt base columnar cells (CBCs), responsible of the constant renewal of the epithelium, and quiescent +4 stem cells, activated during regeneration after tissue damage. I found that p57 is involved in maintaining the quiescence of the +4 reserve stem cells in a CDK independent manner. Indeed, p57^{KO} mice exhibit an increased proliferation in the crypt caused by amplification of +4 stem cells and of the progenitor population (transit amplifying cells), while CBCs are not affected by loss of p57. I also investigated the molecular mechanism by which p57 regulate these cells and found that p57 can bind Ascl2, a transcription factor critical for intestinal stem cell specification and maintenance. My result indicates that p57 can inhibit Ascl2 activity by participating in a transcriptional repressor complex with HDAC7 and mSin3a. This work has allowed the identification of a new function of p57 in intestinal stem cells during development and that could also be important during intestinal tumorigenesis.

The second aim of this project was to develop a new culture model to study intestinal stem cells. So far, most *in vitro* studies have been limited to 2D surfaces or 3D organoid cultures that do not fully recapitulate the tissue's 3D architecture, microenvironment and cell compartmentalization existing *in vivo*. First, I developed a new photosensitive hydrogel amenable for culture of colorectal cancer cell lines that can be processed using high-resolution 3D printing stereolithography to create scaffolds mimicking the architecture of intestinal epithelium. Finally, I showed that these 3D scaffolds support the cell growth of for 3 weeks, and that 3D culture promotes cell polarization. This model may constitute a complementary approach to organoid cultures to study intestinal homeostasis by allowing guided self-organization and controlled differentiation, as well as for *in vitro* drug screening and testing.

Table des matières

Résumé des travaux	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations	x
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Les cellules souches intestinales	1
I. L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.....	1
1. Organisation.....	1
2. Développement embryonnaire de l'intestin.....	3
II. LES CELLULES SOUCHES INTESTINALES : DEUX MODELES	7
1. Les CBC.....	8
2. Les cellules souches +4.....	13
III. RENOUELEMENT DE L'EPITHELIUM ET REGENERATION	18
1. Maintien de l'homéostasie par les CBC.....	18
2. Régénération et plasticité.....	20
2.1. Les cellules souches +4 : une population de réserve dédiée	20
2.2. Plasticité des progéniteurs.....	21
IV. NICHE ET MICROENVIRONNEMENT	26
1. Principales voies de signalisation de la niche	26
1.1. Signalisation Wnt.....	26
1.2. Signalisation Eph/éphrine	30
1.3. Signalisation BMP	30
1.4. Signalisation EGF.....	31
1.5. Signalisation Notch.....	32
1.6. Signalisation Hippo.....	34
2. La niche épithéliale : les cellules de Paneth.....	38
3. Niche mésenchymateuse.....	39
4. La matrice extracellulaire.....	40
V. LIGNAGES ET DIFFERENCIATION.....	43
1. Lignage sécréteur.....	43
1.1. Les cellules de Paneth.....	43
1.2. Les cellules en gobelet.....	44
1.3. Les cellules entéroendocrines	44
1.4. Les cellules de Tuft.....	44
2. Lignage absorbif.....	45
2.1. Les entérocytes.....	45
2.2. Les cellules M.....	45
Chapitre 2 : p57 ^{Kip2} , inhibiteur des complexes cyclines/CDK.....	47

I.	LE CYCLE CELLULAIRE.....	47
1.	<i>Les différentes étapes du cycle cellulaire</i>	47
2.	<i>Rôles des cyclines et CDK</i>	48
3.	<i>Régulation des complexes cyclines/CDK par les CKIs</i>	49
II.	STRUCTURE ET REGULATION DE P57.....	53
1.	<i>La protéine p57</i>	53
2.	<i>Régulation de l'expression et distribution de p57</i>	54
3.	<i>Le gène CDKN1C et les pathologies associées</i>	55
3.1.	<i>Perte de fonction : le syndrome Beckwith-Wiedemann</i>	58
3.2.	<i>Gain de fonction : syndromes IMAGe et Silver-Russell</i>	60
3.3.	<i>p57 et cancer</i>	61
3.4.	<i>Les modèles animaux</i>	62
III.	FONCTIONS DE P57	65
1.	<i>p57 : régulateur du cycle cellulaire</i>	65
2.	<i>Fonctions non canoniques de p57</i>	66
2.1.	<i>Régulation du cytosquelette</i>	66
2.2.	<i>Rôle dans l'apoptose</i>	67
2.3.	<i>Régulation de la transcription</i>	68
2.4.	<i>Régulation de la différenciation</i>	69
2.5.	<i>Régulation des cellules souches</i>	71
	Chapitre 3 : modèles de culture pour l'ingénierie tissulaire	75
I.	DE LA CULTURE 2D AU MODELES 3D	76
1.	<i>Evolution vers les modèles de culture 3D</i>	76
2.	<i>Sphéroïdes et organoïdes</i>	78
II.	APPORT DES TECHNIQUES DE MICROFABRICATION EN INGENIERIE TISSULAIRE.....	80
1.	<i>Microstructuration de modèles de culture</i>	81
2.	<i>L'impression 3D et la bioimpression pour la génération de support de culture</i>	84
3.	<i>Apport de la microfluidique : le développement des organes sur puces</i>	91
III.	MATERIAUX MIMANT LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	95
1.	<i>Matériaux d'origine naturelle</i>	96
2.	<i>Matériaux synthétiques</i>	97
IV.	MODELES DE CULTURE MICROFABRIQUES DE L'INTESTIN	103
1.	<i>Reproduction de la topographie</i>	103
2.	<i>Gut-On-Chip : reproduction de la composante mécanique</i>	107
	Hypothèses et objectifs	111
	Résultats	113
I.	1 ^{ER} OBJECTIF : ROLE DE P57 DANS LA MAINTENANCE ET LA SPECIFICATION DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES.	113
	<i>Introduction</i>	113
	<i>Matériel et Méthodes</i>	114
	<i>Résultats</i>	123
1.	<i>Rôle de p57 dans les cellules souches intestinales</i>	123
1.1.	<i>Altération du développement intestinal chez les souris p57^{KO}</i>	123

1.2.	Dérégulation des cellules souches intestinales.....	125
1.3.	Confirmation de la dérégulation des cellules souches en absence de p57	127
2.	<i>Mécanisme moléculaire par lequel p57 contrôle la prolifération des cellules souches intestinales</i>	134
2.1.	p57 interagit avec Ascl2 et inhibe son activité transcriptionnelle.....	134
2.2.	p57 participe à la formation d'un complexe répresseur présent au niveau des promoteurs cibles d'Ascl2	137
	<i>Conclusion</i>	142
II.	2 ^{EME} OBJECTIF : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE 3D D'EPITHELIUM INTESTINAL	143
	Discussion	163
I.	ROLE DE P57 DANS LES CELLULES SOUCHES INTESTINALES	163
	<i>p57 détermine-t-il le devenir des cellules souches ?</i>	163
	<i>Mécanisme moléculaire par lequel p57 contrôle les cellules souches intestinales</i>	167
	<i>p57 : suppresseur de tumeur dans l'intestin ?</i>	169
II.	DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MODELE DE CULTURE EN 3D.....	172
	Références Bibliographiques	177

Liste des figures

Figure 1 : La paroi intestinale	1
Figure 2 : Organisation de l'épithélium intestinal	2
Figure 3 : Morphogénèse des villosités	5
Figure 4 : Morphogénèse des cryptes	7
Figure 5 : Souris reportrice Lgr5-eGFP-IRES-creERT2	9
Figure 6 : Lgr5 potentialise la signalisation Wnt.....	10
Figure 7 : Traçage génétique des CBC	10
Figure 8 : Modèle de culture <i>ex vivo</i> , les organoïdes.....	11
Figure 9 : Traçage génétique des cellules Hopx ⁺	16
Figure 10 : Les cellules souches intestinales	17
Figure 11 : Les CBC ont un mode de division symétrique.....	19
Figure 12 : Modèle de régénération de l'épithélium	25
Figure 13 : Voie de signalisation Wnt	28
Figure 14 : Signalisation Notch et l'inhibition latérale	33
Figure 15 : Gradients inverses de facteurs de croissance	36
Figure 16 : Interconnexion entre les différentes voies de signalisation.....	37
Figure 17 : Microenvironnement des cellules souches intestinales	42
Figure 18 : Différenciation des cellules épithéliales.....	46
Figure 19 : Le cycle cellulaire	48
Figure 20 : Régulation de l'activité des CDK	50
Figure 21 : Structures des protéines p21, p27 et p57.....	51
Figure 22 : Structure de p57 et ses principaux interactants	53
Figure 23 : Contrôle de l'empreinte parentale du locus 11p15.5	57
Figure 24 : Mutations de CDKN1C dans les syndromes génétiques.....	60
Figure 25 : Les souris p57 ^{KO} présentent de nombreuses anomalies du développement.....	63
Figure 26 : Phénotypes indépendants de l'inhibition des CDK	64
Figure 27 : Régulation de l'apoptose par p57	68
Figure 28: L'ingénierie tissulaire pour récapituler la complexité du vivant	75
Figure 29 : Evolution des modèles de culture cellulaires vers les modèles 3D.....	77
Figure 30 : Les techniques de lithographie douce	82
Figure 31 : La stéréolithographie en ingénierie tissulaire.....	87
Figure 32 : Les trois approches majeures de bioimpression	90
Figure 33 : Puce microfluidique	92
Figure 34 : Les organes sur puce	94
Figure 35 : Structure d'un hydrogel	96
Figure 36 : Réaction de photopolymérisation du PEG-DA en présence d'Irgacure 819	99
Figure 37 : Réaction de couplage EDC/NHS	101
Figure 38 : Modèle de culture reproduisant la topographie intestinale	106
Figure 39 : Modèle d'intestin-sur-puce	108
Figure 40 : p57 joue un rôle essentiel dans le développement intestinal indépendamment des CDK	123
Figure 41 : Augmentation de la prolifération dans les cryptes en absence de p57.....	124
Figure 42: Dérégulation des cellules souches intestinales chez les souris p57 ^{KO}	126

Figure 43 : L'absence de p57 n'affecte pas le nombre des CBC mais cause une augmentation du nombre de progéniteurs.....	128
Figure 44 : Confirmation de l'augmentation des progéniteurs en absence de p57par immunomarquage	129
Figure 45 : L'absence de p57 entraîne une augmentation du nombre de cellules souches +4	131
Figure 46 : p57 est exprimé dans les cellules souches +4.....	133
Figure 47 : p57 interagit avec Ascl2	135
Figure 48 : p57 inhibe l'activité transcriptionnelle d'Ascl2	136
Figure 49 : p57 participe à la formation d'un complexe répresseur	138
Figure 50 : Interaction entre Ascl2 et le complexe corépresseur	139
Figure 51 : p57 ^{CK-} peut interagir avec le complexe corépresseur	140
Figure 52 : Le complexe corépresseur est présent sur les promoteurs cibles d'Ascl2	141
Figure 53 : Modèle proposé pour la régulation des cryptes intestinales par p57.....	142
Figure 54 : Hypothèse sur la fonction de p57 dans la détermination du destin des cellules souches.....	165
Figure 55 : p57 module l'expression de Hes1 ?	168
Figure 56 : Délétion de p57 spécifiquement dans les cellules souches	170
Figure 57 : Etude du rôle de p57 dans la tumorigénèse intestinale par croisement avec les souris Apc	171
Figure 58 : Propriétés mécaniques de l'hydrogel	173
Figure 59 : Intégration du scaffold dans un système microfluidique.....	175

Liste des tableaux

Table 1 : Résumé des cellules impliquées dans la régénération	24
Table 2 : Phénotypes associés à la perte des protéines Cip/Kip	52
Table 3 : Critères de diagnostic du syndrome de Beckwith-Wiedemann.....	58
Table 4 : Caractéristiques des syndromes Silver-Russell et IMAGE.....	61
Table 5 : Résumé des phénotypes observés chez les animaux p57 ^{KO} , p57 ^{p27K1} et p57 ^{CK-}	64
Table 6 : Avantages et inconvénients des techniques de microstructuration.....	91
Table 7 : Liste des amorces de qPCR	119
Table 8 : Amorces utilisées pour les qChIP.....	121

Liste des abréviations

2D	2 Dimensions
3D	3 Dimensions
7AAD	7-Aminoactinomycin D
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Alpi	Alkaline phosphatase intestinal
Apc	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide Ribonucléique
Ascl2	Achaete-scute-like 2
Atoh1	Atonal Homolog 1
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Axin	Axis inhibitor
BAD	Bcl-2 associated death promotor
BASC	Bronchioalveolar Stem Cell
Bcl2	B-cell lymphoma 2
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
Bmi1	B Lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	BMP Receptor
BWS	Beckwith-Wiedemann Syndrome
CAK	CDK Activating Kinase
CAO	Conception Assistée par Ordinateur
CBC	Crypt Base Columnar Cells
CDK	Cyclin Dependent Kinase
Cdx2	Caudal-type homeobox 2
ChgA	Chromogranin A
CK1	Casein Kinase 1
CKI	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
Clu	Clusterin
DKK1	Dickkopf-1
Dll1	Delta Like 1
Dnmt1	DNA Méthyltransferase 1
DSS	Dextran Sodium Sulfate
Dvl	Disheveled
E2F	E2 promoter binding Factor
EDC	1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride
EE	Entéroendocrine

EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Receptor
EGR1	Early growth response gene 1
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
Eph	Erythropoïétine-Producing Hepatocellular
Ephrines	Eph receptor-interacting
ES	Embryonic stem
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
Foxl1	Forkhead Box 11
FOXO	Forkhead transcription factor class O
Fz	Frizzled
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GATA	Erythroid transcription Factor
GDNF	Glial-Derived Neurotrophic Factor
Gel-MA	Gélatine Methacrylate
Gfi1	Growth Factor Independent 1
GFP	Green Fluorescent Protein
Gli1	Glioma associated oncogene 1
GLP2	Glucagon Like Peptide 2
Gpr49	G-protein coupled receptor 49
GRE	Glucocorticoid Response Element
GSK3	Glycogen Synthase kinase 3
H2B	Histone 2B
HDAC	Histone Déacétylase
Herp	Hes-related repressor protein
Hes1	Hairy/enhancer of Split
HK	Hexokinase
HNF4	Hepatocyte nuclear factor-4
Hopx	Homeodomain Only Protein homeobox
Hsc70	Heat shock cognate 70
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICR	Imprinted Control Region
Id1	Inhibitor of DNA binding 1
Igf2	Insulin Like Growth Factor 2
Ihh	Indian Hedgehog
IL	Interleukine

IMAGe	Intrauterin Growth Retardation, Metaphyseal dysplasia, Adrenal insufficiency, Genital abnormalities
Ink4	Inhibitor of CDK4
iPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells
Jak	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KDa	Kilo Dalton
KO	Knock out
Krt19	Kératine 19
LATS1/2	Large Tumor Suppressor kinases 1/2
Lct	Lactase
Lgr5	Leu-rich repeat containing G protein coupled receptor 5
LIFT	Laser Induced Forward Transfer
LIMK1	LIM Domain Kinase 1
LIT1	Long QT Intron Transcript 1
LOH	Loss Of Heterozygotie
LRC	Label Retaining Cells
Lrig1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
Lrp5/6	LDL receptor related protein 5 /6
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MOB1	Mps One Binder 1
Mst1/2	Mammalian Ste20-like kinase 1/2
mTert	Mouse Telomerase reverse transcriptase
Muc	Mucine
NF-κB	Nuclear Factor- κB
Ngn3	Neurogenin 3
NHS	N- hydroxysuccinimide ester
NICD	Notch Intra-Cellular Domain
NLS	Nuclear Localization Site
Olfm4	Olfactomedin-4
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCP	Planar Cell Polarity
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDMS	polydiméthylsiloxane
PEG	Poly(Ethylène)Glycol
PEG-DA	Poly(Ethylène)Glycol-DiAcrylate
PEO	polyethylene oxide
PFA	ParaFormAldéhyde

PHEMA	poly(hydroxymethyl methacrylate)
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP2/3	Phosphatidyl Inositol bi/tri phosphate
PLA	Proximity Ligation Assay
PLGA	poly-lactic-glycolic acid
Pou2f3	POU class 2 homeobox 3
Prox1	Prospero Homeobox Protein 1
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVA	poly(vynil alcohol)
Rac 1	Ras-related C3 botulinum substrate 1
RANK	Receptor Activator of nuclear factor κ -B
Rb	Rétinoblastome
RBPJ κ	Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region
rCPG	Récepteur couple aux protéines G
Reg4	Regenerating Family member 4
Rho	Ras homologous
Rnf43	Ring Finger protein 43
Rock	Rho Kinase
Ror2	Récepteur de type tyrosine kinase orphan 2
R-spo	R-spondin
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
Sav1	Salvador homolog 1
SCF	Stem Cell factor
Shh	Sonic Hedgehog
Shp2	Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Silencing RNA
SLA	Stéréolithographie apparatus
Sma	Smooth Muscle Actin
SMAD	Mothers Against Decapentaplegic homolog
Smoc2	SPARC-related modular calcium-binding 2
Sox9	SRY-box 9
Sp1	Stimulatory protein 1
Spdef	Sam pointed domain ETS factor
SRS	Silver-Russell Syndrome
STL	Stéréolithographie
TA	Transit Amplifying

TAZ	Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
Tcf	T Cell Factor
TEAD	TEA Domain family Member 1-4
TGF	Transforming Growth Factor
UPD	Uniparental Disomy
UV	Ultraviolet
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
Wnt	Wingless-type MMPTV integration site
WT	Wild Type
YAP	Yes associated Protein
Znrf3	Zinc/ring finger protein 3
β NF	β -naphthoflavone
β -TrCP	β -Transducing Repeat-Containing Protein

Introduction

Chapitre 1 : Les cellules souches intestinales

L'intestin est la portion du tube digestif qui s'étend de la sortie de l'estomac à l'anus, dont la fonction majeure est la digestion. La digestion est le processus au cours duquel les aliments sont dégradés afin de permettre l'absorption des nutriments par l'organisme. L'intestin est subdivisé en deux segments aux fonctions différentes : l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le colon. Alors que l'intestin grêle est le site principal d'absorption des nutriments, le colon a pour fonction essentielle la récupération d'eau et des électrolytes. L'intestin constitue également une barrière efficace contre les micro-organismes toxiques ou carcinogènes présents dans la lumière du tube digestif. Afin d'assurer l'intégrité de cette barrière, l'épithélium est constamment renouvelé, tous les 3 à 5 jours, ce qui fait de l'intestin l'un des tissus les plus renouvelés chez l'adulte.

I. L'épithélium intestinal

1. Organisation

Le tractus intestinal est un tissu complexe composé de quatre couches fonctionnelles distinctes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (**Figure 1**).

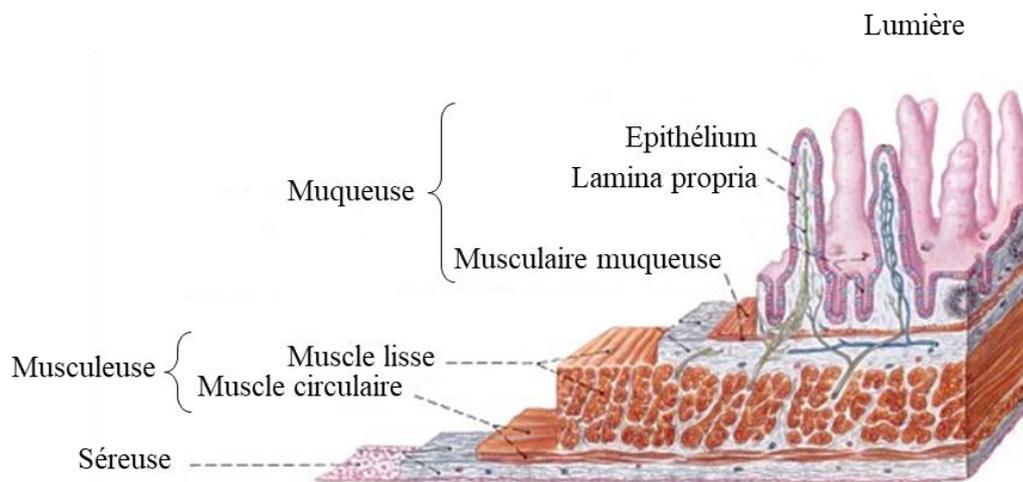


Figure 1 : La paroi intestinale

La lumière du tube digestif est bordée par un épithélium qui repose sur la *lamina propria*, la sous-muqueuse et la couche musculaire. (Anatomie & physiologie humaine, Marieb E.N, 2014).

La séreuse ou adventice est une couche externe conjonctive qui forme le tissu de soutien des vaisseaux sanguins et des nerfs. La musculuse, est constituée des deux couches de muscles lisses, une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Cette paroi musculaire assure le péristaltisme permettant la progression du bol alimentaire le long du tube digestif. Au-dessus de la musculuse se trouve la sous-muqueuse, un tissu conjonctif constitué de cellules stromales, elle contient les artères et vaisseaux lymphatiques nécessaires à l'absorption des nutriments. Enfin la muqueuse, qui assure les fonctions d'absorption, borde la lumière du tube digestif et est composée d'un épithélium reposant sur une couche de tissu conjonctif, la *lamina propria*, et d'une couche musculaire lisse responsable des mouvements locaux et des replis de la muqueuse (**Figure 1**) (Volk and Lacy, 2017).

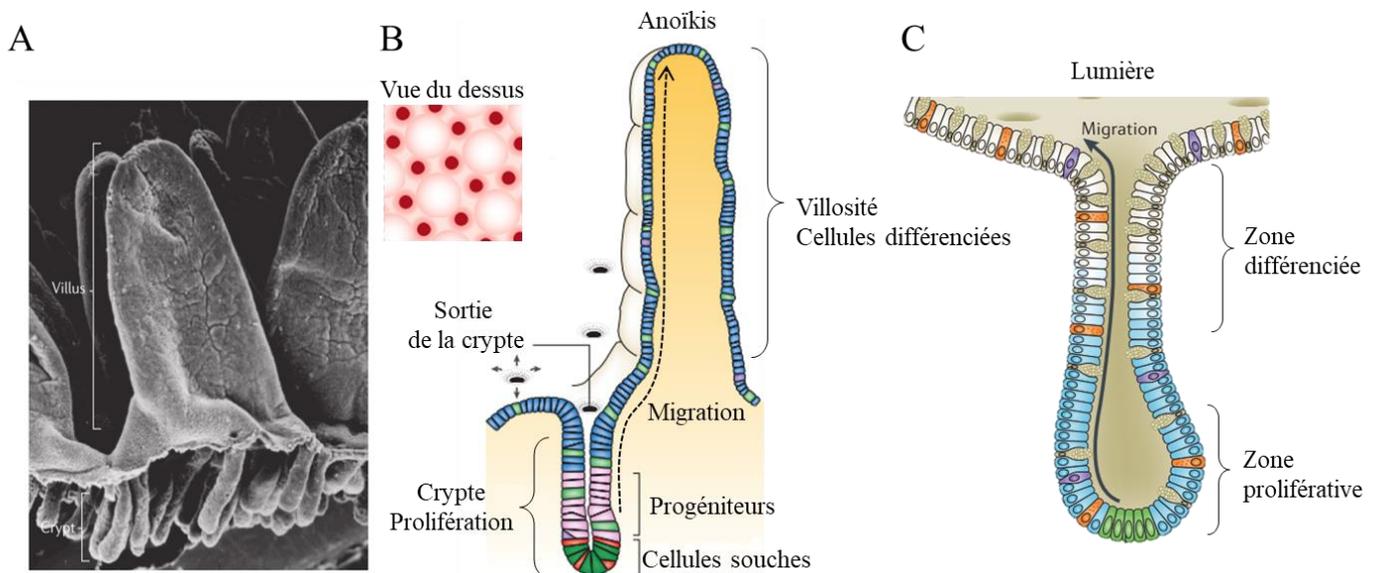


Figure 2 : Organisation de l'épithélium intestinal

(A) Image en microscopie électronique de l'épithélium intestinal (Barker N., 2014). (B) Représentation schématique de l'épithélium intestinal. Les cellules prolifératives sont localisées en bas des cryptes où elles se divisent régulièrement et donnent les progéniteurs qui vont se différencier en cellules épithéliales matures. Au cours de la différenciation, les cellules migrent du bas des cryptes vers le haut des villosités, puis tombent dans la lumière du tube digestif et deviennent apoptotiques. (D'après Crosnier et al, 2006). Chaque villosité est approvisionnée par plusieurs cryptes (au moins 6), visible sur le schéma de la vue du dessus (Gehart & Clevers, 2019). Dans le colon, les villosités sont absentes et la muqueuse présente une surface lisse (C). (D'après Barker N., 2014)

La muqueuse de chaque organe présente une organisation particulière nécessaire à la fonction de ceux-ci. Afin d'augmenter la surface d'absorption, la muqueuse de l'intestin grêle présente une architecture caractéristique en cryptes et villosités. Les villosités sont des projections de l'épithélium dans la lumière du tube digestif, la base des villosités est entourée

par plusieurs cryptes (au moins 6), appelées cryptes de Lieberkühn, qui sont des invaginations de l'épithélium dans la *lamina propria*. Les cellules souches et progéniteurs intestinaux se situent au fond de ces cryptes ce qui les protège des agressions liées à la digestion. Chez l'homme, les villosités mesurent en moyenne 500 µm de hauteur avec un diamètre d'environ 150 µm. Les cryptes ont une profondeur d'environ 150 µm et un diamètre de 50 µm (Dutton et al., 2019). Au niveau du colon, la muqueuse forme uniquement des cryptes d'une profondeur d'environ 400 µm (Dutton et al., 2019), et présente une surface lisse (Barker, 2014; Clevers, 2013a) (Figure 2).

Les cellules souches, localisées en bas des cryptes, se divisent régulièrement et donnent des progéniteurs (les transit-amplifying cells). Ces progéniteurs, se divisent à leur tour 4 à 5 fois, et se différencient en cellules épithéliales matures tout en migrant vers la base des villosités. Au niveau des villosités, les cellules sont totalement différenciées et ne se divisent plus, la migration vers le haut continue et après 3 à 5 jours les cellules atteignent le haut des villosités où elles tombent dans la lumière du tube digestif et meurent par anoïkis (apoptose déclenchée suite à la perte d'adhésion d'une cellule à la matrice extracellulaire) (Barker, 2014) (Figure 2). L'épithélium intestinal est composé de 6 types cellulaires répartis en deux lignages : le lignage absorbant, formé d'entérocytes et des cellules M, et le lignage sécréteur comprenant les cellules en gobelet, les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth et les cellules de Tuft. Ces types cellulaires seront détaillés dans la partie lignage et différenciation.

2. Développement embryonnaire de l'intestin

L'épithélium intestinal est issu de l'endoderme. Chez la souris (21 jours de gestation), le tube intestinal primitif est complètement formé après 9 jours de développement embryonnaire (E9.5). A ce stade, le tube primitif est composé d'un épithélium pseudostratifié polarisé entouré du mésoderme (Grosse et al., 2011; Matsumoto et al., 2002). Le développement intestinal (élongation, formation des villosités et des cryptes) est coordonné grâce à de nombreux échanges entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent. Suite à la fermeture du tube primitif, l'épithélium et le mésenchyme prolifèrent rapidement ce qui entraîne un allongement du tube ainsi qu'une augmentation de la paroi et de la lumière intestinale (Chin et al., 2017).

L'élongation du tube intestinal est un processus continu qui débute vers E10.5, avant la formation des villosités, et se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Cette élongation est en partie médiée par le facteur de croissance Wnt5a (Bakker et al., 2012; Cervantes et al., 2009; Yamada et al., 2010). Wnt5a agit via une voie de signalisation indépendante de β -caténine, la voie Wnt/PCP (Planar Cell Polarity). Il se fixe sur le récepteur Frizzled et un co-récepteur, Ror2

(récepteur de type tyrosine kinase orphan 2), entraînant une réorganisation du cytosquelette via l'activation des GTPases RhoA et Rac1. Cette voie de signalisation est principalement impliquée dans la régulation de la polarité cellulaire et des mouvements morphogénétiques au cours du développement embryonnaire (Kikuchi et al., 2012; Niehrs, 2012).

Au cours de l'élongation intestinale, Wnt5a est exprimé par les cellules mésenchymateuses et un défaut d'expression (surexpression ou absence) entraîne un fort raccourcissement intestinal (diminution d'environ 80%) (Bakker et al., 2012; Cervantes et al., 2009). Les défauts de morphogénèse sont visibles dès E10.5, et seraient causés par une diminution de la prolifération des cellules épithéliales ainsi qu'un défaut d'intégration des cellules post-mitotiques au niveau de l'épithélium (Cervantes et al., 2009). Chez ces animaux, aucun défaut n'a été observé au niveau des cellules souches et progéniteurs et de leur différenciation. Le récepteur majeur de Wnt5a, Ror2, est exprimé à la fois par les cellules du mésenchyme et les cellules épithéliales. De manière intéressante, les souris déficientes pour Ror2 (Ror2^{-/-}) présentent un phénotype similaire, cependant moins important, avec une diminution de la longueur du tube intestinal d'environ 60% (Yamada et al., 2010). De plus aucun défaut de prolifération n'a été observé chez les souris KO (knock-out) pour Ror2, ce qui suggère que d'autres récepteurs de Wnt5a sont impliqués. En addition à Wnt5a, d'autres signalisations ont lieu entre le mésenchyme et l'épithélium qui peuvent affecter l'élongation du tube intestinal, notamment les signaux Hedgehog. La délétion de Indian Hedgehog et Sonic Hedgehog dans les cellules épithéliales à E10.5 résulte en un défaut de prolifération des cellules mésenchymateuses et en un fort raccourcissement intestinal (diminution d'environ 90%) (Mao et al., 2010).

Simultanément à l'élongation, un épaississement de la paroi se produit entre E12.5 et E14.5, l'épithélium est alors formé d'une couche de cellules hautes (50µm) et fines et définit une lumière étroite. La formation des villosités débute suite à cet épaississement de la paroi, à E14.5, la surface devient alors sinueuse et la taille des cellules diminue (Walton et al., 2016a).

Les villosités émergent tout d'abord au niveau du duodénum puis se propagent le long de l'intestin vers l'iléon en 24 h. La première étape de la formation des villosités consiste en l'agrégation de cellules mésenchymateuses sous l'épithélium, ces amas apparaissent à E14.5 au niveau du duodénum puis, de la même façon que les villosités, se propagent vers l'iléon (Karlsson et al., 2000; Walton et al., 2012). Lorsque les amas se forment, les cellules

épithéliales sous-jacentes se raccourcissent, ce qui entraîne une déformation de l'épithélium et l'émergence des villosités (Walton et al., 2012) (Figure 3).

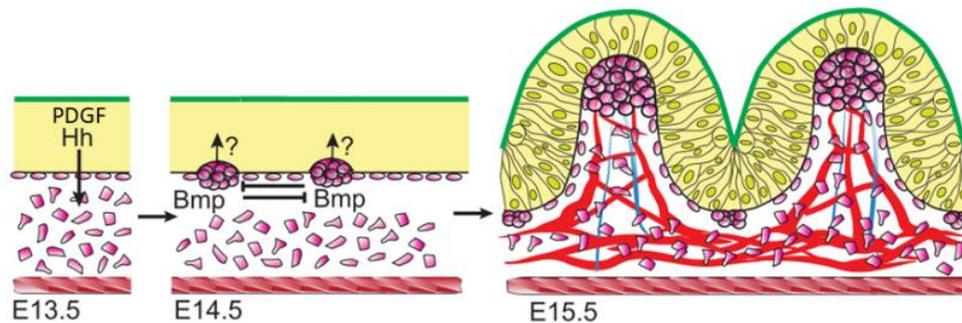


Figure 3 : Morphogénèse des villosités

La morphogénèse des villosités débute à E14.5 au niveau du duodénum suite à l'apparition de clusters de cellules mésenchymateuses qui répondent aux signaux Hedgehog et PDGF- α sécrétés par l'épithélium. Les clusters, dont la distribution et la taille sont régulées par les signaux BMP, vont coordonner la formation de villosités via la sécrétion de signaux ce qui entraîne l'émergence d'une villosité au-dessus de chaque cluster. (Walton K.D. et al., 2016)

L'aggrégation des cellules mésenchymateuses en clusters est dépendante des facteurs Hedgehog (Hh) sécrétés par l'épithélium (Walton et al., 2012). Il a été montré *in vitro*, que le blocage de la voie Hh inhibe la formation des clusters puis des villosités, inversement, la présence d'un agoniste entraîne une augmentation de la taille des amas et des villosités (Walton et al., 2012). Une fois formés, les clusters sont non prolifératifs et expriment de nombreux facteurs de croissance suggérant qu'ils coordonnent la morphogénèse des villosités. En effet, un défaut d'espacement ou de distribution des amas entraîne un défaut d'espacement ou du nombre de villosités. Par exemple, les cellules mésenchymateuses présentes au niveau des clusters expriment le récepteur PDGFRA (Platelet Derived Growth Factor récepteur α) et répondent au ligand PDGF- α sécrété par les cellules épithéliales. Une perte de PDGF- α ou PDGFRA entraîne une diminution du nombre de clusters, ce qui aboutit à une diminution du nombre de villosités qui sont plus espacées et irrégulières (Karlsson et al., 2000). L'espacement et la distribution des clusters semble être régulé par les signaux BMP (Walton et al., 2016b).

Au fur et à mesure de l'élongation, de nouveaux clusters apparaissent provoquant la formation de nouvelles villosités entre 2 villosités existantes. Ce phénomène se déroule en plusieurs cycles successifs entraînant 4 séries d'émergence de villosités, chacun doublant le nombre de villosités (Walton et al., 2012). Un autre mécanisme de remodelage épithélial a récemment été proposé pour expliquer l'augmentation exponentielle du nombre de villosités suite à leur émergence. Après l'apparition des premières villosités grâce aux amas mésenchymateux, le nombre de villosités augmenterait par un mécanisme de bifurcation ou

fission des villosités. Par des techniques d'imagerie 3D, ce processus de fission a été observé avec la présence de villosités à 2 sommets, et grâce à une approche de modélisation mathématique, il a été mis en évidence que ce mécanisme de fission des villosités était suffisant et plus juste pour expliquer l'augmentation du nombre de villosités (GuIU et al., 2019).

Vers E16.5, l'épithélium s'engage dans la différenciation. Ce processus entraîne la formation d'un compartiment non prolifératif et différencié, les villosités, et d'un compartiment prolifératif et immature, les domaines intervillositaires qui contiennent les progéniteurs et cellules souches. L'identité des cellules est ensuite définie par leur localisation au sein de l'épithélium et par le microenvironnement (GuIU et al., 2019).

Les cryptes se développent après la naissance, par invagination des domaines intervillositaires dans le mésenchyme, elles sont complètement formées entre 7 et 14 jours post-natal (P7-P14) chez la souris, ce qui coïncide avec l'apparition des cellules de Paneth (Langlands et al., 2016). Les mécanismes à l'origine de ce remodelage restent peu connus, cependant grâce à une approche transcriptomique et des outils génétiques, une étude récente a identifié deux étapes clés de la morphogénèse des cryptes. Tout d'abord, une contraction apicale des cellules épithéliales, médiée par les myosines de type II A et C, entraîne l'initiation de l'invagination de l'épithélium (entre P0 et P5). Suite à cette invagination, il y a une compartimentalisation des cellules en cryptes et villosités via la formation d'une région charnière. Ces régions charnières sont courbées et possèdent des cellules présentant une morphologie particulière avec une surface apicale élargie et un côté basal contraint. Ce remodelage morphologique est dépendant de Rac1, qui inhibe les intégrines $\alpha4/\beta6$ et la formation d'hémidesmosomes, résultant en un attachement des cellules à la matrice plus faible et donc permettant un changement de forme (**Figure 4**). Les souris Rac1 KO conditionnelles, présentent un défaut d'architecture intestinale avec des cryptes allongées et élargies et des villosités raccourcies ce qui aboutit à un défaut d'assimilation des nutriments (Sumigray et al., 2018).

Le nombre de cryptes augmente ensuite rapidement jusqu'à 4 semaines après la naissance par un mécanisme de bifurcation (cryptes à 2 bases) ou fission des cryptes (Cheng and Bjerknes, 1985).

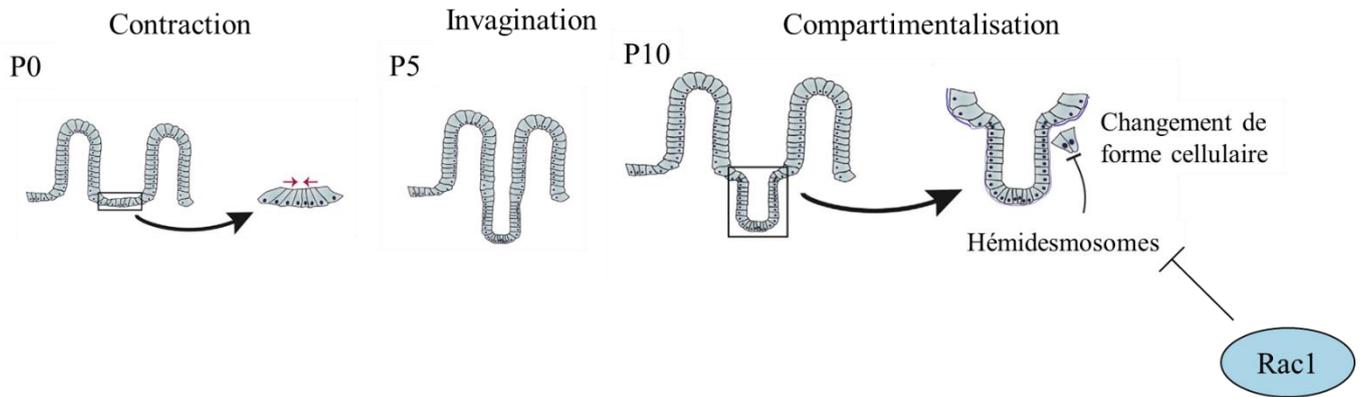


Figure 4 : Morphogénèse des cryptes

La contraction apicale des cellules épithéliales entraîne l'invagination des cryptes, puis Rac1 contrôle la formation de régions charnières qui vont permettre la compartimentalisation des cryptes et des villosités. (Sumigray et al., 2018).

En conclusion, le développement intestinal est un processus complexe, impliquant de multiples signaux et remodelages tissulaires qui permettent l'acquisition d'une architecture crypte/villosité caractéristique. Cette organisation est primordiale pour la fonctionnalité du tissu et permet une ségrégation des cellules souches et des cellules différenciées dans leurs compartiments respectifs. Chez l'adulte, le principal enjeu est de maintenir la structure et la fonctionnalité afin d'assurer l'intégrité du tissu.

II. Les cellules souches intestinales : deux modèles

La maintenance de l'homéostasie tissulaire et l'auto-renouvellement de l'épithélium intestinal sont assurés grâce à la prolifération et à la différenciation constante des cellules souches intestinales. Deux modèles concernant l'identité des cellules souches ont été décrits. Le modèle zone (« stem cell zone ») propose les CBC (Crypt Base Columnar Cells) localisées à la base des cryptes, entre les cellules de Paneth, comme étant les cellules souches résidentes du tissu (Cheng and Leblond, 1974a, b). En opposition, le modèle « +4 », décrit par Potten, propose les cellules localisées en position +4, au-dessus des cellules de Paneth, comme étant les cellules souches intestinales (Potten et al., 1978). Malgré de nombreuses études, l'identité des cellules souches et la relation entre ces deux populations reste soumise à débat.

1. Les CBC

Les CBC, initialement décrites par Cheng & Leblond en 1974, sont localisées à la base des cryptes, intercalées entre les cellules de Paneth. Suite à des injections de ^3H -thymidine, certaines CBC entrent en apoptose et sont phagocytées par les CBC voisines, entraînant l'apparition de phagosomes radioactifs et donc traçables. Ces phagosomes ont été observés dans un premier temps, uniquement au niveau des CBC, puis au cours du temps, des cellules différenciées apparaissent également radioactives au niveau des villosités. Cette première expérience de traçage *in vivo* a permis de mettre en évidence que les CBC sont à l'origine des 4 types cellulaires connus alors dans l'intestin (6 aujourd'hui) (Cheng and Leblond, 1974a, b). Cette observation a été confirmée, grâce à des expériences de mutagenèse chimique, permettant le marquage aléatoire de clones. Deux types de clones ont été observés, des clones de courte durée de vie, ainsi que des clones mixtes à longue durée de vie contenant tous les types cellulaires majeurs de l'intestin (Bjerknes and Cheng, 1999). Cette étude a donc permis de mettre en évidence l'existence de cellules souches pluripotentes et d'un compartiment de progéniteurs plus engagés dans la différenciation.

Le modèle « stem cell zone », repose sur le principe que les cellules souches résident, avec les cellules de Paneth, dans un environnement favorable (la niche) qui se limite au fond de la crypte (position 1 à 4). Les cellules filles, issues de la prolifération des CBC, quittent cette zone des cellules souches et migrent en position + 5, au-dessus de la cellule de Paneth la plus haute, et s'engagent alors vers les différents lignages de l'intestin tout en migrant vers les villosités, à l'exception des cellules de Paneth qui, elles, migrent vers la base des cryptes (Bjerknes and Cheng, 1981a, b).

Parmi les signaux présents au niveau de la crypte, Wnt constitue le principal moteur de la prolifération des CBC. L'établissement d'une signature de gènes cibles de Wnt dans l'intestin a permis d'identifier environ 80 cibles de Wnt exprimées de façon anormale dans les cancers colorectaux et exprimées physiologiquement au niveau des cellules de la crypte (Van der Flier et al., 2007). Cette signature a permis d'identifier le gène *Lgr5* (Leu-rich repeat containing G protein coupled receptor 5) comme premier marqueur des CBC. *Lgr5* marque des cellules fines, localisées en bas de la crypte et intercalées entre les cellules de Paneth, il est également fortement exprimé dans les adénomes intestinaux. Ces cellules *Lgr5*⁺ sont hautement prolifératives avec un cycle de division d'environ 24 h (Barker et al., 2007).

Afin d'étudier la distribution et le devenir de ces cellules $Lgr5^+$, un modèle de souris knock-in *Lgr5-eGFP-IRES-creERT2* a été généré, ces souris ont ensuite été croisées avec un modèle de souris reportrice *Rosa26-LacZ*. En présence de tamoxifène la Cre recombinase devient nucléaire, ce qui entraîne l'expression de LacZ et marque de façon irréversible les cellules *Lgr5* ainsi que leurs descendantes, permettant donc un traçage génétique des CBC (**Figure 5**) (Barker et al., 2007).

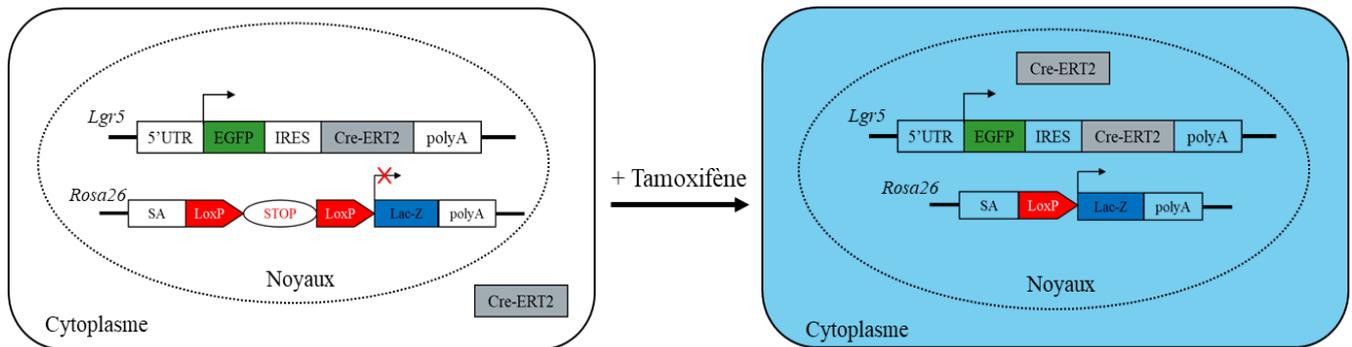


Figure 5 : Souris reportrice *Lgr5-eGFP-IRES-creERT2*

Un modèle de souris reportrice a été généré afin de suivre les CBC. Le premier exon de *Lgr5* a été remplacé par un allèle knock-in qui abolit la fonction du gène *Lgr5* et entraîne l'expression de eGFP et de la protéine de fusion CreERT. Ces souris ont été croisées avec des souris reportrices *Rosa26* exprimant LacZ après recombinaison par la Cre. En présence de tamoxifène, la Cre devient nucléaire, ce qui entraîne une recombinaison entre les séquences LoxP, induisant l'expression de LacZ et la perte de eGFP. Ces souris permettent donc de marquer les CBC avec eGFP et leur descendant expriment la β -galactosidase de manière stable.

Ce traçage génétique induit par le tamoxifène a permis de mettre en évidence l'apparition de ruban clonaux positifs pour LacZ. En 5 jours, ces rubans s'étalent de la base des cryptes jusqu'au haut des villosités et contiennent toutes les lignées cellulaires de l'intestin. La plupart de ces clones persistent toute la vie (**Figure 6**). L'identification de *Lgr5* comme marqueur des CBC et les expériences de traçage génétique *in vivo* ont donc confirmé que les CBC répondent aux caractéristiques des cellules souches intestinales, à savoir l'auto-renouveaulement et la capacité à se différencier vers plusieurs types cellulaires ou multipotence.

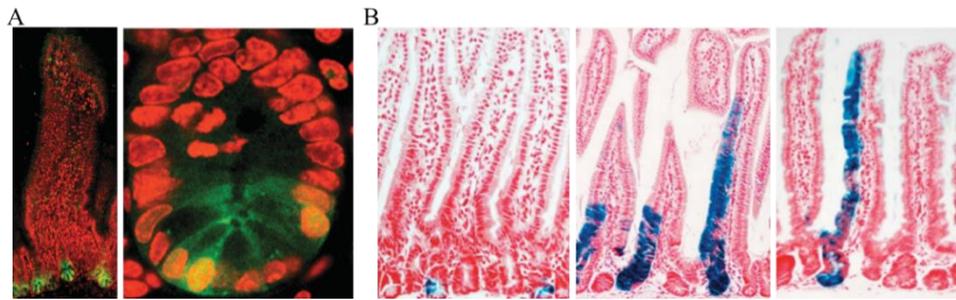


Figure 7 : Traçage génétique des CBC

(A) L'expression de la GFP dans les souris *Lgr5-eGFP-IRES-creERT2* permet la visualisation des CBC. (B) Expression de LacZ après recombinaison induite par le tamoxifène à 1,5 ou 60 jours après induction. (Barker et al., 2007).

Lgr5 ou *Gpr49* code pour un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G (rCPG) caractérisé par un domaine extracellulaire très riche en Leucine (Barker and Clevers, 2007). *Lgr5* et ses homologues, *Lgr4* et *Lgr6* sont des récepteurs pour les R-spondins 1 à 4 (Rspod) qui sont des agonistes de Wnt. Les R-spondins peuvent également se fixer sur les ubiquitines ligases E3 transmembranaires RNF43 et Znf3. En absence de Rspod, RNF43 et Znf3 ubiquitinent le récepteur de Wnt, Frizzled (Fz), ce qui promeut sa dégradation et entraîne une atténuation de la signalisation Wnt (Koo et al., 2012). La liaison des Rspod sur *Lgr5* entraîne une séquestration des ubiquitines ligases RNF43 et Znf3 ce qui stabilise Fz et amplifie la signalisation Wnt (Figure 7) (de Lau et al., 2014; Hao et al., 2012). Depuis sa découverte au niveau des CBC, *Lgr5* a été identifié comme marqueur de cellules souches adultes dans de nombreux tissus, notamment au niveau du foie, du poumon et de la glande mammaire (Leung et al., 2018).

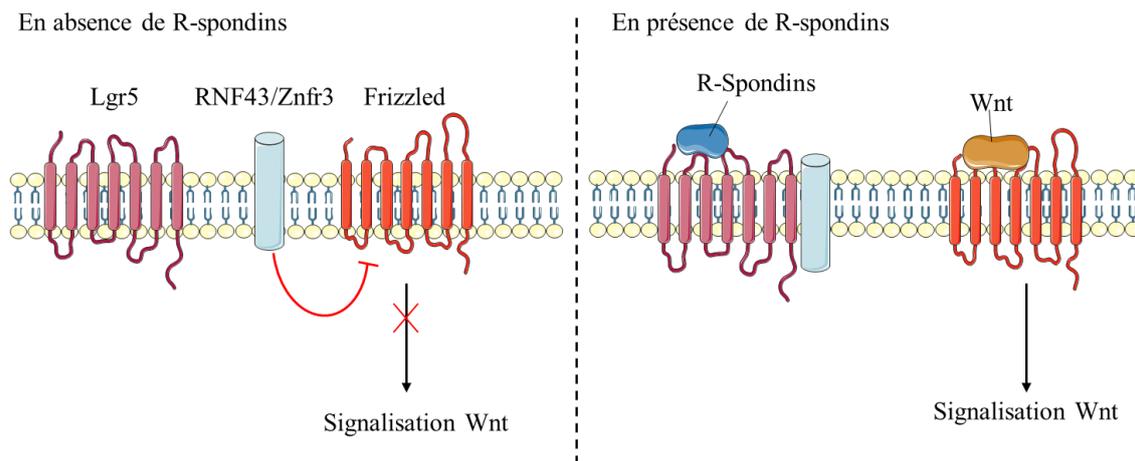


Figure 6 : Lgr5 potentialise la signalisation Wnt

En absence de R-spondins, les ubiquitines ligases RNF43/Znf3 inhibent la voie de signalisation Wnt par ubiquitination du récepteur Frizzled. La fixation de R-spondins sur *Lgr5* entraîne une séquestration des ubiquitines ligases E3 et une stabilisation de Fz, augmentant la signalisation Wnt.

Une preuve supplémentaire du caractère souche des CBC Lgr5⁺ a été apportée par le développement d'un nouveau modèle *ex vivo*, les organoïdes (**Figure 8**). Les organoïdes sont des cultures 3D organotypiques récapitulant l'architecture et l'hétérogénéité tissulaire. Les organoïdes intestinaux sont organisés en cryptes prolifératives, avec des cellules Lgr5⁺ entourées de cellules de Paneth et de progéniteurs, qui alimentent des domaines semblables aux villosités composés de cellules épithéliales matures comprenant tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal. Ces organoïdes peuvent être générés à partir de cryptes intestinales dissociées ou bien d'une seule cellule Lgr5⁺ isolée par cytométrie en flux. Les cellules sont ensuite maintenues en culture dans du Matrigel, une matrice extracellulaire riche en laminine et en collagène, et dans un milieu de culture minimum composé de R-spondin1, EGF et Noggin, un inhibiteur de BMP. De façon intéressante, les cellules Lgr5⁻ ne sont pas capable de générer ces organoïdes (Sato and Clevers, 2013; Sato et al., 2009).

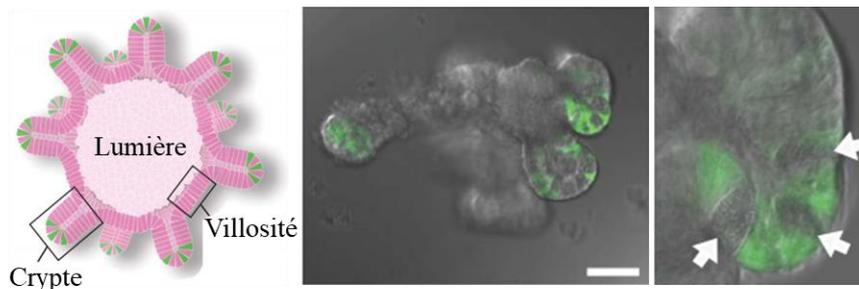


Figure 8 : Modèle de culture *ex vivo*, les organoïdes

Les cellules Lgr5⁺ isolées sont capables de générer des organoïdes. Les organoïdes sont des cultures 3D organisées en domaines prolifératifs de type cryptes contenant les cellules Lgr5⁺ intercalées entre les cellules de Paneth (flèche blanche) et en des domaines différenciés de type villosités contenant tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal bordant une lumière centrale (Sato T. et al, 2009). Barre d'échelle = 50 µm

L'origine des cellules souches Lgr5⁺ reste encore mal connue. En effet, même si les cellules Lgr5⁺ fœtales peuvent donner des cellules Lgr5⁺ adultes (Nigmatullina et al., 2017), des expériences de traçage génétique ont révélé que toutes les cellules intestinales fœtales, quel que soit leur localisation et leurs marqueurs, sont capables de contribuer au pool de cellules souches adultes. Suite au remodelage de l'épithélium et à la fission des villosités, les cellules épithéliales localisées en haut des villosités se retrouvent alors au niveau des domaines prolifératifs intervillositaires où elles acquièrent la possibilité de contribuer au pool de CBC adultes. L'identité des cellules souches semble donc être une caractéristique induite par le microenvironnement et non intrinsèque à la cellule (Guiu et al., 2019).

Des études protéomiques et transcriptomiques sur des cellules LGR5-eGFP isolées par cytométrie en flux ont permis d'établir une signature moléculaire des cellules CBC Lgr5⁺ (Munoz et al., 2012; Van der Flier et al., 2007). Une comparaison des profils transcriptomiques

des cellules souches et des progéniteurs (identifiés par l'intensité de la GFP, faible pour les progéniteurs et forte pour les cellules souches) a révélé 510 gènes enrichis spécifiquement dans les cellules souches (Munoz et al., 2012), de façon attendue, plusieurs des gènes identifiés sont des cibles de Wnt, notamment *Sox9*, *Ephb2* ou *Ascl2*. Cette signature a donc permis l'identification et l'analyse fonctionnelle de nouveaux marqueurs des CBC.

Ainsi, *Ascl2/Mash2* (*Achaete-Scute like 2/Mammalian Achaete-Scute Homologue 2*) a été identifié comme un régulateur majeur des cellules souches intestinales. Le gène *Ascl2* code pour un facteur de transcription bHLH (basic helix-loop-helix). Au cours du développement, il est principalement exprimé au niveau des tissus extra-embryonnaires et le KO *Ascl2*^{-/-} est léthal au stade E10.5, due à des défauts de formation du placenta (Guillemot et al., 1994). Au niveau de l'épithélium intestinal, l'expression d'*Ascl2* est dépendante de Wnt et *Ascl2* est surexprimé dans les cancers intestinaux (Jubb et al., 2006). Dans l'épithélium sain, son expression est restreinte à la base des cryptes, au niveau des CBC. L'expression ectopique d'*Ascl2* dans les villosités entraîne une hyperprolifération du compartiment crypte, une expansion du domaine d'expression des marqueurs de cellules souches, notamment *Lgr5*, et la formation de poches hyper-prolifératives au niveau des villosités. Inversement, la perte d'expression d'*Ascl2* entraîne une perte des cellules souches, ce qui montre qu'*Ascl2* joue un rôle crucial dans le maintien des CBC (van der Flier et al., 2009b). De nombreux gènes de la signature génique des CBC ont été identifiés comme cibles d'*Ascl2*, notamment *Lgr5*, *Sox9* et *EphB3*. Wnt et *Ascl2* agissent de manière synergique afin d'activer la transcription de ces gènes souches, il a également été montré que *Ascl2* forme une boucle d'autorégulation positive et active sa propre transcription en présence de signaux Wnt (Schuijers et al., 2015).

Le gène *Smoc2* (*SPARC-related modular calcium-binding 2*) a également été décrit comme marqueur des cellules CBC *Lgr5*⁺. *Smoc2* est un inhibiteur de BMP (Thomas et al., 2009). Les signaux BMP jouent un rôle dans la différenciation des cellules souches, en effet ils sont actifs au niveau des villosités et inhibent la formation de cryptes *de novo* (Haramis et al., 2004). L'expression spécifique de *Smoc2* au niveau des CBC, et donc sa qualité de marqueur a été validée par traçage génétique *in vivo* grâce à l'utilisation d'un modèle de souris knock-in *Smoc2-EGFP-ires-CreERT2* (Munoz et al., 2012).

D'autres gènes de la signature génique des cellules *Lgr5*⁺ ont été identifiés comme marqueurs des CBC, notamment les ubiquitines Ligase E3 RNF43 et *Znfr3* (Koo et al., 2012). *Olfm4* (Olfactomedin 4), une molécule sécrétée initialement isolée à partir de myoblastes

(Zhang et al., 2002) apparaît également comme un marqueur robuste des CBC (van der Flier et al., 2009a). Olfm4 est une cible de Notch (VanDussen et al., 2012) et a été montrée comme jouant un rôle dans la tumorigénèse colorectale via l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine, sa délétion favorisant la formation d'adénomes chez des animaux déficients pour *Apc* (*Apc*^{+/-}) (Liu et al., 2016). Enfin, les marqueurs Prominin-1 (Zhu et al., 2009b) et Musashi-1 (Kayahara et al., 2003) ont également été décrits comme marqueurs CBC, cependant leur expression s'étend aux progéniteurs (Itzkovitz et al., 2011; Snippert et al., 2009).

De façon surprenante, plusieurs marqueurs des cellules souches +4 ont été retrouvés dans les cellules Lgr5⁺ (Itzkovitz et al., 2011; Munoz et al., 2012), ce qui relance la question sur la relation entre ces deux populations de cellules souches.

2. Les cellules souches +4

Le terme de cellules souches +4 vient de la localisation de ces cellules, situées en position +4 par rapport au bas de la crypte, juste au-dessus de la plus haute cellule de Paneth. Initialement décrites par Potten, les cellules +4 ont été identifiées grâce à leur capacité à retenir un marquage à l'ADN, et appelées LRC (Label Retaining Cells) (Potten, 1998; Potten et al., 1978). En effet, des études réalisées sur d'autres systèmes de cellules souches ont montré que les cellules souches adultes sont généralement quiescentes ou cyclent de façon très lente, un marquage de l'ADN permet donc d'identifier les cellules souches potentielles des tissus qui vont retenir ce marquage par comparaison avec les cellules prolifératives qui vont perdre le marquage au cours de leurs divisions (Cotsarelis et al., 1990; van Velthoven and Rando, 2019). Cependant, par un marquage BrdU, Potten a montré que ces cellules +4 LRC sont prolifératives, avec un cycle d'environ 24h. Ainsi, la rétention du marquage à l'ADN par les cellules +4 ne reflète pas la quiescence. L'hypothèse émise alors est que la rétention du marquage résulte de la ségrégation d'un brin d'ADN à chaque division, ce qui permettrait aux cellules souches de protéger leur matériel génétique face aux mutations (Potten et al., 2002). Il a également été montré que ces cellules +4 étaient impliquées dans la régénération tissulaire à la suite de dommages, qu'elles sont particulièrement radiosensibles, et le point d'origine de migration des autres cellules de la crypte (Potten, 1977, 1998; Potten et al., 2002).

Depuis, de nombreuses études ont porté sur l'identification de marqueurs spécifiques pour ces cellules +4 et la plupart de ces marqueurs révèlent une population de cellules quiescentes et radiorésistantes, qui diffère donc de la population +4 initialement décrite.

Le premier marqueur des cellules souches +4 identifié par traçage génétique est *Bmi1* (Sangiorgi and Capecchi, 2008). *Bmi1* code pour un composant du complexe Polycomb PRC1 qui joue un rôle important dans le maintien de la répression de la chromatine (Valk-Lingbeek et al., 2004). Plusieurs études ont montré l'implication de *Bmi1* dans la maintenance de l'auto-renouvellement des cellules souches ainsi que dans la tumorigénèse, notamment au niveau des tissus hématopoïétiques (Park et al., 2003), neuronaux (Molofsky et al., 2003) et pulmonaires (Dovey et al., 2008). Cet effet est en partie médié par l'inhibition de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16^{Ink4} et p19^{Arf} (Jacobs et al., 1999; Molofsky et al., 2005). La génération d'une souris reproductrice, *Bmi1*^{CreER/+}; *Rosa26*^{LacZ/+} a mis en évidence l'expression de *Bmi1* dans une population cellulaire rare, localisée en position +4/+5 par rapport au bas de la crypte, au niveau de la partie proximale de l'intestin (Sangiorgi and Capecchi, 2008). Des expériences de traçage génétique *in vivo* ont révélé l'apparition de clones, similaires à ceux obtenus avec les cellules *Lgr5*, contenant tous les types cellulaires de l'intestin (Sangiorgi and Capecchi, 2008). Cependant, l'apparition de ces clones issus des cellules *Bmi1*⁺ est plus lente que ceux issus des CBC *Lgr5*⁺, suggérant donc que les cellules souches *Bmi1*⁺ prolifèrent plus lentement. Ces cellules *Bmi1*⁺ sont nécessaires à l'homéostasie tissulaire puisque la perte de cette population entraîne une perte des cryptes (Sangiorgi and Capecchi, 2008). Une étude plus récente a confirmé que *Lgr5* et *Bmi1* marquent des populations distinctes de cellules souches intestinales (Yan et al., 2012). En effet, les auteurs ont mis en évidence que dans un tissu sain, les cellules *Lgr5*⁺ prolifèrent rapidement en réponse à des signaux Wnt, et sont responsables de l'auto-renouvellement constant du tissu, alors que les cellules *Bmi1*⁺ sont quiescentes et insensibles aux signaux de la voie Wnt. Cependant, en cas d'irradiation, les cellules *Bmi1*⁺ sont résistantes et capables régénérer l'épithélium entier y compris le pool de cellules souches *Lgr5*⁺. Ces cellules constituent alors une population de réserve nécessaire à la régénération tissulaire (Tian et al., 2011; Yan et al., 2012). La multipotence des cellules *Bmi1* a été confirmée *in vitro* grâce au modèle organoïde, une cellule *Bmi1*⁺ isolée permet de générer un organoïde entier contenant tous les types cellulaires de l'intestin y compris les cellules *Lgr5*⁺ (Yan et al., 2012). Le modèle proposé est donc que dans un tissu sain l'auto-renouvellement est géré par les cellules souches *Lgr5*⁺, alors que les cellules souche *Bmi1*⁺ permettent une régénération suite à des dommages. Ces expériences de traçage génétique ont donc permis de mettre en évidence le rôle des cellules souches +4, néanmoins, plusieurs études montrent que *Bmi1* n'est pas spécifiquement exprimé dans les cellules +4 et que son expression s'étend aux cellules *Lgr5*⁺ ainsi qu'aux progéniteurs (Itzkovitz et al., 2011; Munoz et al., 2012). De plus, il a été montré grâce à l'utilisation de souris transgéniques que le traçage génétique *Bmi1* pouvait s'initier à des positions aléatoires

de la crypte, en position +4 mais également dans les progéniteurs ainsi que dans les CBC (Munoz et al., 2012). Bmi1 ne peut donc pas être considéré comme un marqueur spécifique des cellules souches +4, d'autres marqueurs potentiels ont donc été investigués par la suite.

Les cellules souches sont relativement résistantes à la sénescence malgré de nombreuses divisions, cette résistance est associée avec des niveaux élevés de télomérases qui permettent de maintenir l'intégrité des chromosomes, normalement raccourcis à la fin de chaque division. mTert (mouse Telomerase reverse transcriptase) est une sous-unité du complexe ribonucléoprotéique nécessaire à la synthèse des télomères, elle est exprimée dans les tissus très prolifératifs et notamment au niveau de l'intestin (Greenberg et al., 1998). La génération d'une souris transgénique mTert-GFP a permis d'identifier une population rare de cellules mTert⁺ localisée en position +4 par rapport au bas de la crypte (Breault et al., 2008). Ces cellules, représentant environ 1,7 % de la population totale, sont distinctes de la population Lgr5⁺ et sont principalement quiescentes, 90 à 95 % sont en phase G₀. Un traçage génétique *in vivo* a permis de mettre en évidence qu'une petite fraction de ces cellules mTert⁺ cycle lentement et contribue à l'homéostasie tissulaire notamment en permettant le renouvellement des cellules prolifératives Lgr5⁺ (Montgomery et al., 2011). De la même façon que les cellules Bmi1⁺, les cellules quiescentes mTert⁺ sont résistantes aux radiations et peuvent être activées en cas de dommages et proliférer pour contribuer à la régénération de l'épithélium en repeuplant le pool de cellules Lgr5⁺ (Montgomery et al., 2011; Suh et al., 2017). Ces études confirment donc l'importance de ces cellules quiescentes qui constituent une population de réserve, indispensable à la régénération tissulaire, et identifient *mTert* comme un marqueur robuste des cellules souches +4. Cependant, plusieurs études ont rapporté l'expression de l'ARNm de *mTert* dans toutes les cellules prolifératives de la crypte dont les CBC (Itzkovitz et al., 2011; Schepers et al., 2011).

Le gène *Hopx* (*Homeodomain Only Protein homeobox*) code pour une protéine homéodomaine atypique qui ne peut pas lier l'ADN et est notamment impliquée dans le développement cardiaque (Chen et al., 2002). L'analyse d'une souris knock-in *Hopx-LacZ* a révélé une robuste expression de *Hopx* au niveau des cryptes intestinales et plus spécifiquement au niveau des cellules souches quiescentes +4. Un traçage génétique a permis de mettre en évidence la multipotence des cellules *Hopx*⁺ qui sont à l'origine de clones contenant tous les types cellulaires de l'intestin, y compris les CBC (**Figure 9**). Afin d'étudier la relation entre les deux types de cellules souches intestinales, les souris *Hopx-LacZ* ont été croisées avec des souris Lgr5^{eGFP-ERCre/+}, et grâce à des expériences de tri cellulaires et de génération d'organoïdes

les auteurs ont montré que les deux populations peuvent être à l'origine de l'autre et se reconstituer en cas de besoin (Takeda et al., 2011). Ces données supportent donc le modèle selon lequel une population de cellules souches quiescente réside en position +4 et est capable d'interagir de façon dynamique avec les cellules souches prolifératives (CBC).

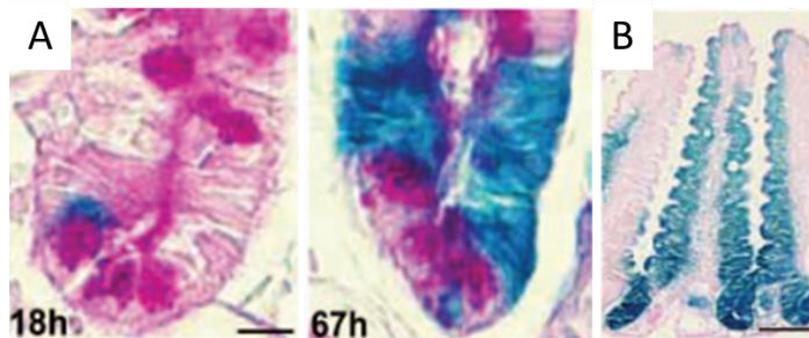


Figure 9 : Traçage génétique des cellules Hopx⁺

Afin d'étudier par traçage génétique le destin des cellules Hopx⁺, une souris Hopx^{ERCre/+};Rosa26^{LacZ/+} a été générée, 18h après injection de tamoxifène, seulement une cellule en position +4 est marquée, 67h après injection, le bas de la crypte est entièrement marqué (A). Les clones issus de ces cellules souches +4 Hopx persistent au moins pendant 13 mois (B). (Takeda N. et al, 2011)

Le facteur de transcription Sox9 (*Sry-Box containing gene 9*) est une cible transcriptionnelle de Wnt, il est exprimé dans le bas de la crypte et est impliqué dans la régulation de la prolifération ainsi que dans la différenciation des cellules de Paneth (Bastide et al., 2007; Blache et al., 2004). L'utilisation d'une souris transgénique Sox9-eGFP a permis de détecter une expression différentielle de Sox9 dans les cellules souches intestinales. Les CBC expriment faiblement Sox9 (Sox9^{Low}) en comparaison aux cellules souches +4 qui l'expriment fortement (Sox9^{High}) (Formeister et al., 2009; Van Landeghem et al., 2012). Le caractère souche des cellules Sox9^{Low} a été confirmé par leur capacité à générer des organoïdes *in vitro* (Van Landeghem et al., 2012) ainsi que par traçage génétique (Furuyama et al., 2011). A l'inverse, les cellules souches Sox9^{High}, deviennent prolifératives suite à des dommages et sont capables de former des organoïdes uniquement après irradiation (Van Landeghem et al., 2012). La génération d'une souris reportrice Sox9-Ires-eGFP a permis de confirmer l'expression de Sox9 dans les cellules souches mais a aussi mis en évidence son expression dans les cellules de Paneth et dans certaines cellules différenciées des villosités, notamment dans les cellules entéroendocrine ou dans les cellules de Tuft (Furuyama et al., 2011). L'expression non spécifique de Sox9 diminue donc sa qualité de marqueur de cellules souches intestinales.

Enfin *Lrig1* (*Leucin-Rich repeats and Immunoglobulin-like domain 1*) a également été décrit comme marqueur des cellules souches +4 (Powell et al., 2012).

Toutes ces études montrent que les cellules souches +4 constituent une population de réserve distincte des CBC Lgr5⁺, relativement quiescentes dans un tissu sain, et résistantes aux radiations, et qui, en cas de dommages, peuvent être activées pour proliférer et repeupler entièrement l'épithélium, y compris les CBC.

Au niveau de l'épithélium intestinal il y a donc coexistence de deux populations de cellules souches actives : les CBC qui prolifèrent rapidement et assurent le maintien de l'intégrité de l'épithélium dans des conditions basales, et les cellules souches +4 quiescentes qui sont activées à la suite de dommages pour régénérer l'épithélium (**Figure 10**) (Li and Clevers, 2010). Cependant la relation entre ces deux populations et la nature de ces cellules souches de réserve reste encore discutées.

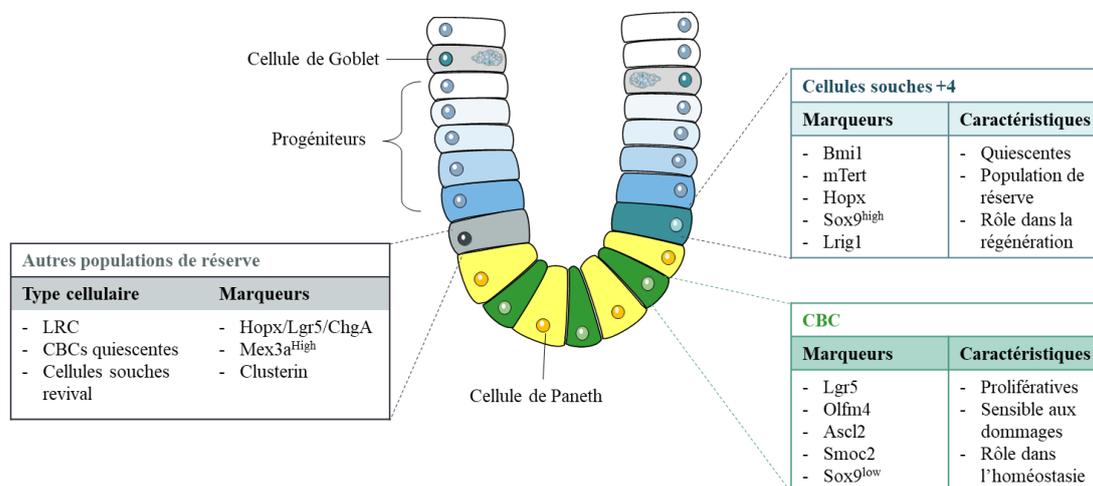


Figure 10 : Les cellules souches intestinales

Résumé des marqueurs et caractéristiques des cellules souches intestinales. Les CBC sont les cellules prolifératives alors que les cellules souches +4 constituent une population de réserve. Récemment d'autres populations cellulaires ont décrites comme étant les cellules de réserve.

Une étude réalisée par Buczacki *et al.* (2013) a permis d'unifier les théories concernant l'identité des cellules souches intestinales. Les auteurs ont génétiquement marqué les LRC grâce à un modèle de souris permettant l'expression temporaire de H2B-YFP (Histone H2B-Yellow Fluorescent Protein). Ces LRC, localisées à la base de la crypte, expriment à la fois les marqueurs des cellules de la lignée sécrétrice, les marqueurs des CBC et ceux des cellules +4 (Lgr5, Hopx, mTert, ChgA). Grâce à des analyses fonctionnelles *in vivo* et *in vitro* de ces cellules, les auteurs ont montré que ces LRC sont résistantes à des doses intermédiaires d'irradiation et représentent des précurseurs sécréteurs destinés à devenir des cellules de Paneth ou des cellules entéroendocrines. Ces LRC, sont issues des CBC Lgr5⁺ et sont capable de se

dédifférencier pour revenir à un état souche dans des conditions de régénérations après dommages, permettant alors de reconstituer la population de CBC (Buczacki et al., 2013; Clevers, 2013b). Plus récemment, une population de cellules Mex3a^{High} a été décrite comme étant des CBC quiescentes, exprimant à la fois les marqueurs des CBC et des cellules +4, et capable de régénérer l'épithélium en cas d'irradiation (Barriga et al., 2017). Cette étude confirme donc l'existence d'une population intermédiaire +4/CBC, quiescente et impliquée dans la régénération tissulaire. Cependant, ces résultats contredisent les observations établies par Potten indiquant que les LRC sont particulièrement sensibles aux radiations (Potten, 1977; Potten et al., 2002). De plus, il a été démontré récemment que les LRC, les CBC et les cellules souches de réserve (Hopx⁺, Bmi1⁺) représentent bien des populations cellulaires distinctes au niveau moléculaire et fonctionnel (Li et al., 2016b).

Enfin grâce à une analyse transcriptomique sur cellules uniques, une nouvelle population de cellules souches a récemment été décrite. Cette population appelée cellule souche « revival » identifiée par le marqueur *Clu* (*clusterin*), est une population cellulaire rare et quiescente, localisée autour de la position +4, moléculairement distincte des CBC et des cellules souches +4 et requise pour la régénération. Suite à des dommages, les cellules Clu⁺ s'amplifient transitoirement, via un mécanisme YAP1 dépendant, afin de reconstituer les CBC et donc de régénérer l'épithélium (Ayyaz et al., 2019).

Toutes ces études révèlent donc une forte hétérogénéité cellulaire au sein de la crypte intestinale (**Figure 10**). Malgré la description de marqueurs distincts pour chaque population, la hiérarchie et les liens de parenté existant entre ces différentes populations souches restent encore incertains. Il est notamment possible que certaines populations se chevauchent, comme illustré dans l'étude transcriptomique des CBC révélant l'expression de marqueurs +4 dans ces cellules (Munoz et al., 2012).

III. Renouveaulement de l'épithélium et régénération

1. Maintien de l'homéostasie par les CBC

L'auto-renouveaulement de l'épithélium intestinal est assuré par la division des CBC, qui prolifèrent rapidement afin de générer des progéniteurs. En homéostasie, le nombre de cellules souches reste fixe, une balance s'installe donc entre la maintenance de la population souche et la différenciation. Une stratégie afin d'assurer l'auto-renouveaulement des cellules souches ainsi que la génération de progéniteurs est la division asymétrique au cours de laquelle une cellule

souche se divise en deux cellules différentes : une nouvelle cellule souche et un progéniteur. Alternativement, les cellules souches peuvent également subir des divisions symétriques afin de générer deux cellules souches ou bien deux cellules différenciées, dans ce cas l'asymétrie est maintenue à l'échelle globale (Morrison and Kimble, 2006).

Les CBC subissent des divisions symétriques et génèrent deux cellules filles identiques (deux progéniteurs ou deux cellules souches), l'équilibre entre le nombre de cellules souches et de progéniteurs est donc maintenu au niveau de la population globale et la perte d'une cellule souche est compensée par la multiplication d'une cellule souche voisine (Snippert et al., 2010). Au niveau de la crypte intestinale, il y a en moyenne 14 CBC qui se divisent aléatoirement symétriquement en 2 progéniteurs ou 2 cellules souches. Au cours du temps, les clones sans cellule souche vont s'éteindre et un seul clone subsiste, la crypte devient alors monoclonale (Figure 11).

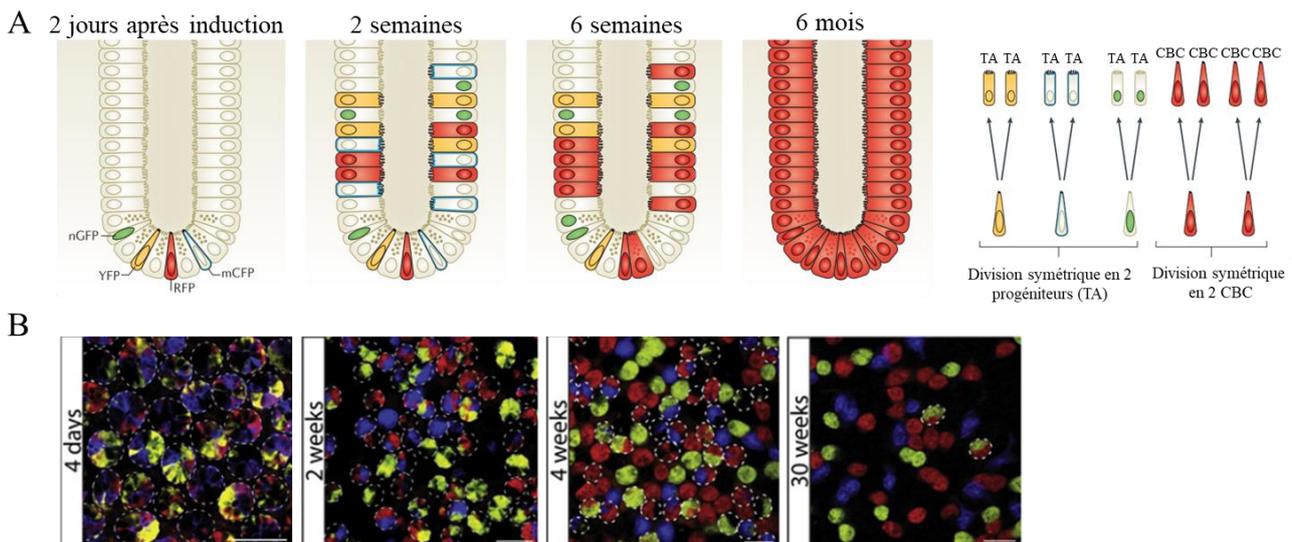


Figure 11 : Les CBC ont un mode de division symétrique

(A) Un traçage multicolore réalisé avec une souris Rosa26-confetti a permis de marquer différemment plusieurs CBC dans une même crypte. Chaque CBC se divise en deux progéniteurs de la même couleur ce qui aboutit à la formation de rubans multicolores au bout de deux semaines. Au cours du temps, la compétition entre les clones due à la division symétrique des cellules souches entraîne une dérive vers la monoclonalité et les cryptes deviennent monochromes (Barker N., 2014). (B) Images en yz des cryptes marquées par la souris Rosa26-Confetti au cours du temps (Snippert H.J. et al, 2010).

Ce mode de division stochastique, connu sous le nom de « neutral drift dynamics », a été confirmé *in vivo* grâce à une approche de traçage génétique multicolore (Figure 11) (Lopez-Garcia et al., 2010; Snippert et al., 2010).

Cependant, une étude sur la relation entre l'orientation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes a rapporté un mode de division asymétrique prédominant des CBC (Quyn et

al., 2010). Néanmoins ces résultats sont controversés, le mode division symétrique des CBC a été confirmé dans plusieurs études à la fois par l'analyse de l'orientation du fuseau mitotique (Bellis et al., 2012) et de la rétention de l'ADN (Escobar et al., 2011; Schepers et al., 2011), qui suggèrent une distribution aléatoire des chromosomes entre les cellules filles. Au sein de la crypte, le mode de division symétrique semble donc prédominer et le choix de lignage (cellules souches ou progéniteurs) est ensuite contrôlé par des signaux extérieurs. En effet, de l'imagerie *in vivo* a montré que suite à la division des CBC en bas de la crypte, les CBC les plus hautes sont poussées vers le haut, en dehors de la niche, et deviennent alors des progéniteurs. Le destin post-mitotique des CBC est ensuite déterminé par la compétition entre différents signaux extérieurs distribués spatialement au sein du microenvironnement (Ritsma et al., 2014).

2. Régénération et plasticité

L'épithélium intestinal possède une capacité remarquable à se régénérer en réponse à des lésions variées. En effet, l'irradiation, l'administration de doxorubicine ou encore l'injection de toxine diphtérique ciblée aux cellules Lgr5⁺, entraîne une perte complète des CBC. Cependant, quelques jours après les dommages, les CBC réapparaissent à la base des cryptes et l'épithélium est complètement restauré ce qui indique qu'un mécanisme permet la repopulation des CBC indépendamment de leur auto-renouvellement (Dekaney et al., 2009; Tian et al., 2011; Van Landeghem et al., 2012). Cette capacité régénérative de l'épithélium intestinal a été attribuée aux cellules souches +4 constituant une population de réserve. Néanmoins, des études récentes ont aussi montré une capacité des cellules matures à se différencier pour revenir à un état souche.

2.1. Les cellules souches +4 : une population de réserve dédiée

Les cellules souches +4 identifiées par les marqueurs Bmi1, Hopx, ou mTert sont relativement quiescentes et résistantes aux dommages. Les expériences de traçages génétiques ont clairement démontré la multipotence et la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules, ainsi que leur rôle primordial dans la régénération tissulaire. Ce rôle de cellules souches de réserve a été décrit pour la première fois en 2011 grâce à un modèle d'ablation génétique inductible des CBC (souris exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur Lgr5) (Tian et al., 2011). Après injection de toxine diphtérique, les cellules Lgr5⁺ meurent et pourtant les cryptes restent intactes, montrant que l'auto-renouvellement de l'épithélium peut être maintenu en absence de CBC, notamment grâce aux cellules Bmi1⁺ qui

servent alors de source alternative de cellules souches. Dès l'arrêt de la toxine, les CBC réapparaissent, et sont issues des cellules Bmi1⁺ (Tian et al., 2011). Ce rôle des cellules Bmi1⁺ a été confirmé après dommages induits par irradiations. En effet, les cellules Lgr5⁺ sont particulièrement sensibles aux radiations, inversement les cellules Bmi1⁺ sont résistantes et deviennent prolifératives, repeuplant le pool de CBC (Yan et al., 2012).

Ce modèle basé sur l'existence de 2 populations de cellules souches, a été confirmé par l'utilisation d'autres marqueurs *in vivo*, notamment Hopx (Li et al., 2016b; Li et al., 2014; Takeda et al., 2011) et mTert (Montgomery et al., 2011). Ces cellules +4 sont essentielles à la régénération puisqu'en cas de perte des cellules mTert⁺, un défaut de régénération de l'épithélium est observé (Suh et al., 2017). Néanmoins, il a également été montré que les CBC sont également nécessaires à la régénération post-radiation (Metcalf et al., 2014), ce qui est cohérent avec le modèle dans lequel les cellules souches +4 repeuplent les CBC après dommages. La mobilisation des cellules souches +4 et la reprise de la prolifération est dépendante de l'activation de la voie de signalisation Wnt, et particulièrement du ligand Wnt2b qui est fortement augmenté après irradiation (Suh et al., 2017).

En addition à ces cellules souches +4, d'autres populations souches dédiées à la régénération ont été décrites comme les LRC (Buczacki et al., 2013), les CBC quiescentes Mex3a (Buczacki et al., 2013) ou plus récemment les cellules souches Clu⁺ (Ayyaz et al., 2019).

En résumé, en cas de dommages, les cellules souches +4, entrent en prolifération afin de générer les progéniteurs et de maintenir l'autorenouveau de l'épithélium. Ces cellules +4 génèrent également des CBC afin de régénérer le pool de cellules souches Lgr5⁺.

2.2. Plasticité des progéniteurs

Les cellules souches se divisent et produisent des progéniteurs très prolifératifs appelés transit-amplifying cells. Ces progéniteurs se divisent 4 à 5 fois et s'engagent progressivement vers le lignage absorptif ou sécrétoire (van der Flier and Clevers, 2009). Ces cellules prolifératives expriment certains marqueurs de cellules souches comme Musashi-1 (Itzkovitz et al., 2011), Prominin-1 (Snippert et al., 2009), ainsi que le facteur de transcription Id1 (Inhibitor of DNA binding 1) (Zhang et al., 2014). Le choix entre les deux lignages dépend notamment de la signalisation de Notch et de la présence ou de l'absence du facteur de transcription Atoh1 (Atonal Homolog-1). L'activation de Notch entraîne l'expression de Hes1 et la répression d'Atoh1 et du ligand Dll1 (Delta-like 1), ce mécanisme connu sous le nom d'inhibition latérale est détaillé dans la partie signalisation Notch de ce chapitre (p.32).

L'activation de Notch entraîne la différenciation vers le lignage absorptif alors que l'absence de signalisation Notch favorise le lignage sécrétoire (van Es et al., 2010 ; Yang et al., 2001). Les progéniteurs sécréteurs expriment Dll1 ainsi que le facteur de transcription Atoh1, à l'inverse les progéniteurs absorptifs expriment Hes1 (Ishibashi et al., 2018; van Es et al., 2012b). Les progéniteurs sécréteurs ou absorptifs s'engagent ensuite vers la différenciation terminale sous l'action de différents signaux et facteurs de transcription (détaillé p.43).

Parallèlement au modèle de cellules souches de réserve dédiées, plusieurs études récentes ont montré une plasticité importante des cellules de la crypte. La plasticité est définie comme la capacité d'une cellule à adopter une autre identité cellulaire en réponse à des facteurs extrinsèques ou intrinsèques. La dédifférenciation est une forme de plasticité au cours de laquelle une cellule différenciée revient à un état moins différencié voire souche au sein du même tissu (Tetteh et al., 2015).

Les progéniteurs sécréteurs Dll1⁺ sont localisés en position +5, juste au-dessus de la dernière cellule de Paneth (van Es et al., 2012b). Un traçage génétique réalisé avec des souris Dll1-GFP-IRES-CreERT2;R26-LacZ a montré que dans des conditions homéostatiques ces cellules Dll1⁺ génèrent des petits clones uniquement formés de cellules sécrétrices. A contrario, après irradiation et perte des CBC, les cellules Dll1⁺ vont générer des clones de longue durée contenant tous les types cellulaires. De plus, ces cellules Dll1⁺ sont capables de générer des cellules Lgr5⁺ *in vitro* et d'établir des organoïdes en réponse à un traitement Wnt3a (van Es et al., 2012b). Ainsi les progéniteurs sécréteurs Dll1⁺ sont capables de se reconvertir en CBC en cas de lésions des cryptes intestinales.

L'expression de Dll1 est associée avec une augmentation de l'expression du facteur de transcription Atoh1. Au sein de la crypte les cellules Atoh1⁺ ont été décrites comme représentant une population cellulaire hétérogène comprenant à la fois les progéniteurs sécréteur Dll1⁺ mais également les LRC (Ishibashi et al., 2018). Dans un tissu sain, les précurseurs sécréteurs Atoh1⁺ sont capables d'auto-renouvellement et sont à l'origine de clones multi-lignages avec une fréquence plus importante que les précurseurs Dll1⁺, suggérant qu'une partie des cellules Atoh1⁺ agit comme cellules souches. Ces cellules possèdent également une capacité de dédifférenciation importante et il a été montré que leur présence est indispensable à la régénération de l'épithélium au niveau du colon (Castillo-Azofeifa et al., 2019; Ishibashi et al., 2018; Tomic et al., 2018). Cette plasticité entre les différentes populations est régulée via la phosphorylation d'Atoh1 par les CDK (Cyclin Dependent Kinase). Ce mécanisme a été

mise en évidence par l'utilisation de phospho-mutants empêchant la phosphorylation d'Atoh1, ce qui entraîne une différenciation augmentée vers le lignage sécréteur et un défaut de régénération de l'épithélium intestinal (Tomic et al., 2018).

D'autres cellules, engagées plus loin dans la lignée sécrétrice, peuvent également revenir à un état souche, notamment les précurseurs entéroendocrine (EE). Ces cellules expriment Bmi1 ainsi que Prox1 (*prospero homeobox 1*), un facteur de transcription exprimé dans les cellules EE différenciées (Petrova et al., 2008). Des analyses transcriptomiques réalisées sur cellules uniques ont révélé que les cellules Bmi1⁺ représentent des précurseurs EE alors que les cellules Prox1⁺ comprennent des progéniteurs des cellules EE et également des cellules de Tuft. Ces cellules Bmi1⁺ et Prox1⁺ sont plus matures que les précurseur Dll1⁺ précédemment décrits et sont également capables de régénération notamment via un remodelage et une réouverture de la chromatine pour revenir à un état permissif similaire à celui des CBC (Jadhav et al., 2017; Yan et al., 2017).

Les cellules de Paneth, complètement différenciées, représentent également une source potentielle de cellules souches dans la réponse régénérative. Suite à des radiations ou des dommages chimiques, les cellules de Paneth entrent en prolifération pour revenir à l'état souche et expriment alors les marqueurs des CBC comme Lgr5 ou Olfm4 en réponse à une augmentation de la signalisation Notch (Jones et al., 2018; Yu et al., 2018). Cette plasticité des cellules de Paneth a également été montrée dans un modèle inflammatoire. Dans ce contexte, la dédifférenciation des cellules de Paneth est causée par une activation de la signalisation SCF/c-kit qui aboutit à une augmentation de la signalisation Wnt via l'activation de PI3K/Akt et l'inhibition de GSK3 β (Schmitt et al., 2018).

La plasticité des cellules de la crypte n'est pas limitée à la lignée sécrétrice, les précurseurs de la lignée absorptive présentent également des capacités régénératives. Un traçage génétique a permis de mettre en évidence la capacité des précurseurs entérocytaires Alpi⁺ (phosphatase alcaline intestinale) à revenir à l'état souche en cas de déplétion des CBC par la toxine diphtérique. Au cours de leur reprogrammation, les cellules Alpi⁺ présentent une augmentation de l'expression des gènes souches et une diminution des marqueurs spécifiques des entérocytes. Cette capacité de dédifférenciation est limitée aux progéniteurs des entérocytes, les entérocytes matures ayant déjà quittés la crypte et migrés dans les villosités ne sont pas capable de régénérer les CBC Lgr5⁺ (Tetteh et al., 2016).

Enfin, d'autres progéniteurs prolifératifs sont également décrits comme possédant des capacités régénératives en cas de perte des CBC comme les progéniteurs Krt19⁺ (Asfaha et al., 2015).

<i>Type cellulaire</i>	<i>Marqueurs (Traçage génétique)</i>	<i>Mécanisme moléculaire identifié lors de la mobilisation cellulaire</i>	<i>Références</i>
Cellules souches +4	Bmi1/Hopx/mTert	Activation de la voie Wnt	(Tian et al., 2011; Takeda et al., 2011; Montgomery et al., 2011)
LRC	H2B	Inconnu	(Buczacki et al., 2013)
CBC quiescentes	Mex3a	Inconnu	(Barriga et al., 2017)
Cellules souches Rev	Clu	Activation de Yap	(Ayyaz et al., 2019)
Progéniteur sécréteur	Dll1/Atoh1	Phosphorylation Atoh1 Remodelage de la chromatine	(van Es et al., 2012; Ishibashi et al., 2018; Tomic et al., 2018)
Progéniteur entéroendocrine	Bmi1/Prox1	Remodelage de la chromatine	(Yan et al., 2017; Jadhav et al., 2017)
Cellules de Paneth	Lysozyme 1	SCF/c-kit → PI3K/Akt → inhibition de GSK3β → Activation de Wnt Activation de Notch	(Schmitt et al., 2018; Yu et al., 2018)
Précurseur entérocyte	Alpi	Remodelage de la chromatine	(Tetteh et al., 2016)
Progéniteurs	Krt19	Inconnu	(Asfaha et al., 2015)

Table 1 : Résumé des cellules impliquées dans la régénération

D'après De Sousa et al., 2019

Malgré de nombreuses études rapportant des capacités de plasticité au sein de la crypte, les mécanismes moléculaires de cette reprogrammation cellulaire restent peu connus. Plusieurs études ont cependant décrit que la plasticité au sein de la crypte était facilitée par la configuration de la chromatine des progéniteurs. En effet, des études portant sur l'investigation des marques épigénétiques ont montrées des profils de méthylation et de modifications des histones similaires à la fois dans les cellules souches et dans les progéniteurs sécréteurs et absorbifs, ainsi qu'une hypersensibilité à la DNase I, indiquant un état permissif de la chromatine conservé dans les progéniteurs (Jadhav et al., 2016; Kaaij et al., 2013; Kim et al., 2014b). Les régions régulatrices seraient donc facilement accessibles pour les facteurs de transcription, dont l'expression est gouvernée par les différents facteurs du microenvironnement. Cependant, des études plus précises ont démontré une modification de méthylation au cours de la maturation avec notamment la méthylation de gènes souches

comme *Olfm4* et *Hes1*, et inversement un faible niveau de méthylation au niveau des gènes marqueurs de différenciation tels que *Alpi* ou *Lct* (*Lactase*) dans les cellules différenciées (Sheaffer et al., 2014). En accord avec ces résultats, la perte de *Dnmt1* (*DNA méthyltransferase I*) entraîne une hyper-prolifération des cryptes associée à une hypométhylation des gènes souches sans affecter la différenciation vers les différents lignages (Sheaffer et al., 2014). De plus, des réarrangements de la chromatine avec une réouverture au niveau des gènes souches ont été observés au cours de la dédifférenciation de certains progéniteurs (Jadhav et al., 2017). Ces études soulignent donc l'importance des régulations épigénétiques au cours de la différenciation des cellules souches ainsi que de la reprogrammation/dédifférenciation des précurseurs. Elles indiquent également que cellules souches et progéniteurs possèdent une chromatine permissive permettant de maintenir une certaine plasticité au sein de la crypte.

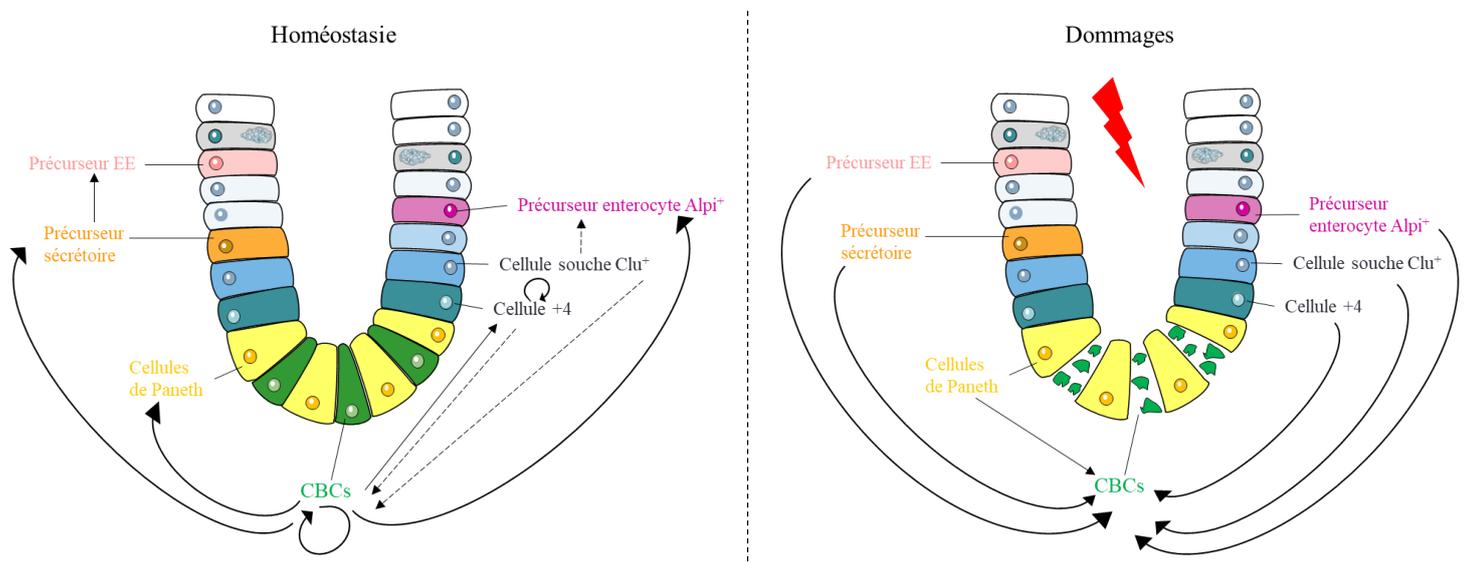


Figure 12 : Modèle de régénération de l'épithélium

Dans un tissu sain, l'auto-renouveaulement de l'épithélium intestinal est assuré par les CBC qui prolifèrent rapidement et se différencient vers tous les types cellulaires de l'intestin. Les cellules souches +4 ou Clu^+ contribuent faiblement à ce renouvellement mais se divisent périodiquement pour renouveler le pool de CBC. En cas de dommages, comme l'exposition à des radiations ou des agents chimiques, les CBC entrent en apoptose. Certaines cellules sont capables de survivre et vont assurer la régénération du tissu. Cette régénération est notamment médiée par les cellules +4 et Clu^+ qui sont mobilisées et repeuplent l'épithélium et les CBC, mais également grâce à la dédifférenciation de certains progéniteurs déjà engagés dans un lignage ou de cellules différenciées.

En conclusion, l'épithélium intestinal présente des capacités de régénération remarquables dues à la mobilisation et la prolifération de nombreux types cellulaires qui possèdent la capacité de revenir à l'état souche (Table 1, Figure 12). Cette plasticité est similaire à celle observée lors du développement, où les cellules différenciées sont capables de devenir des cellules

souches suite à un remodelage de l'épithélium et du microenvironnement (Guin et al., 2019). Il est donc possible que la mobilisation/dédifférenciation des progéniteurs ou des cellules +4 soit déclenchée par des signaux extracellulaires émanant de la niche et notamment par la signalisation Wnt. En effet, suite à des dommages, une forte augmentation des niveaux de ligands Wnt et de leur cibles a été observée (Ashton et al., 2010; Flanagan et al., 2015), et cette activation de la voie Wnt/ β -caténine a été montrée comme indispensable à l'activation des cellules +4 mTert⁺ (Suh et al., 2017).

IV. Niche et microenvironnement

Le terme de niche désigne un compartiment anatomique comprenant des composants cellulaires et non cellulaires fournissant un microenvironnement nécessaire au maintien des propriétés et de l'activité des cellules souches. La niche des cellules souches intestinales est très complexe et résulte de l'ensemble des composants fournis par les cellules épithéliales, mais aussi par la muqueuse ou la lumière intestinale. Les composants de la muqueuse comprennent la matrice extracellulaire et les cellules stromales sous-jacentes. Inversement, la lumière du tube digestif est peuplée du microbiote et exposée à de nombreux agents pathogènes, ce qui peut également fortement impacter l'épithélium. Tous ces composants vont sécréter de nombreux facteurs de croissances, cytokines et protéines de la matrice extracellulaire afin de contrôler le devenir des cellules souches. Le microenvironnement varie le long de l'axe crypte/villosité, avec des signaux prolifératifs au niveau de la crypte et des signaux de différenciation dans les villosités, ce qui permet de réguler la balance entre prolifération et différenciation (Santos et al., 2018; Smith et al., 2017).

1. Principales voies de signalisation de la niche

L'homéostasie intestinale est finement contrôlée par la compétition et l'équilibre entre plusieurs voies de signalisation majeures, notamment les voies de signalisation Wnt, Notch, BMP, EGF et Hippo, dont l'activité conduit à l'expression d'un large panel de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration ou encore la différenciation.

1.1. Signalisation Wnt

La voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine est le signal majeur de prolifération des cellules souches intestinales. Le gène *Wnt1*, initialement nommé *Int-1* (*Integration-1*) a été identifié en 1982 chez la souris en tant que proto-oncogène dans le cancer mammaire (Nusse and Varmus, 1982). Il a été découvert par la suite que *Int-1* est en fait l'homologue du

morphogène *Wg* (*Wingless*) de la drosophile, qui joue un rôle crucial dans le contrôle de la polarité pendant le développement embryonnaire (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Rijsewijk et al., 1987). La cascade de signalisation et les effecteurs impliqués dans la signalisation Wnt ont ensuite été découverts chez la drosophile. A ce jour, 19 gènes *Wnt* (*Wingless/Integrated*) hautement conservés au cours de l'évolution, codant pour des glycoprotéines riches en cystéines d'environ 40 KDa, et 10 récepteurs Fz appartenant à la famille des rCPG ont été décrits (Nusse and Clevers, 2017). Au cours de leur synthèse, les protéines Wnt sont palmitoylées par l'enzyme Porcupine au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui permet leur sécrétion mais aussi leur liaison sur leurs récepteurs (Janda et al., 2012; Takada et al., 2006; Willert et al., 2003). L'effecteur clé de la cascade de signalisation Wnt est la β -caténine cytoplasmique.

En absence de signaux Wnt, un complexe de dégradation de la β -caténine, composé des protéines GSK3 β (Glycogen Synthase kinase 3), CK1 (Casein Kinase 1), β -TrCP (β -Transducing Repeat-Containing Protein) et des protéines scaffold Axine et APC (Adenomatous Poliposis Coli) (Stamos and Weis, 2013), séquestre la β -caténine et permet sa phosphorylation par les kinases CK1 puis GSK3 β (Liu et al., 2002). La β -caténine phosphorylée est alors reconnue par l'ubiquitine ligase E3 β -TrCP, qui est également présente au niveau du complexe de dégradation, ce qui aboutit à sa dégradation par le protéasome (Kitagawa et al., 1999; Li et al., 2012). La présence de ligand Wnt entraîne la formation d'un complexe récepteur formé de Frizzled et LRP5/6 (Low density lipoprotein Receptor Related protein) (Tamai et al., 2000). La formation de ce complexe Wnt/Fz/LRP permet le recrutement de la protéine scaffold Disheveled (Dvl), sur la partie cytoplasmique de Fz. Dvl va alors recruter l'Axine et ses protéines kinases associées GSK3 β et CK1 au niveau de la membrane, ce qui entraîne la phosphorylation de la partie cytoplasmique de LRP5/6 par GSK3 β et CK1 (Zeng et al., 2008). La phosphorylation de LRP fournit des sites d'ancrage pour Axine séquestrant ainsi le complexe de dégradation à la membrane (Tamai et al., 2004). La séquestration du complexe de dégradation à la membrane entraîne sa déstabilisation et un défaut d'ubiquitination par β -TrCP de la β -caténine, qui s'accumule dans le cytoplasme (Li et al., 2012). La β -caténine libre va alors transloquer dans le noyau et interagir avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor), pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Wnt (Behrens et al., 1996). En absence de β -caténine, les facteurs TCFs sont associés à Groucho, un répresseur transcriptionnel (Cavallo et al., 1998) (**Figure 13**).

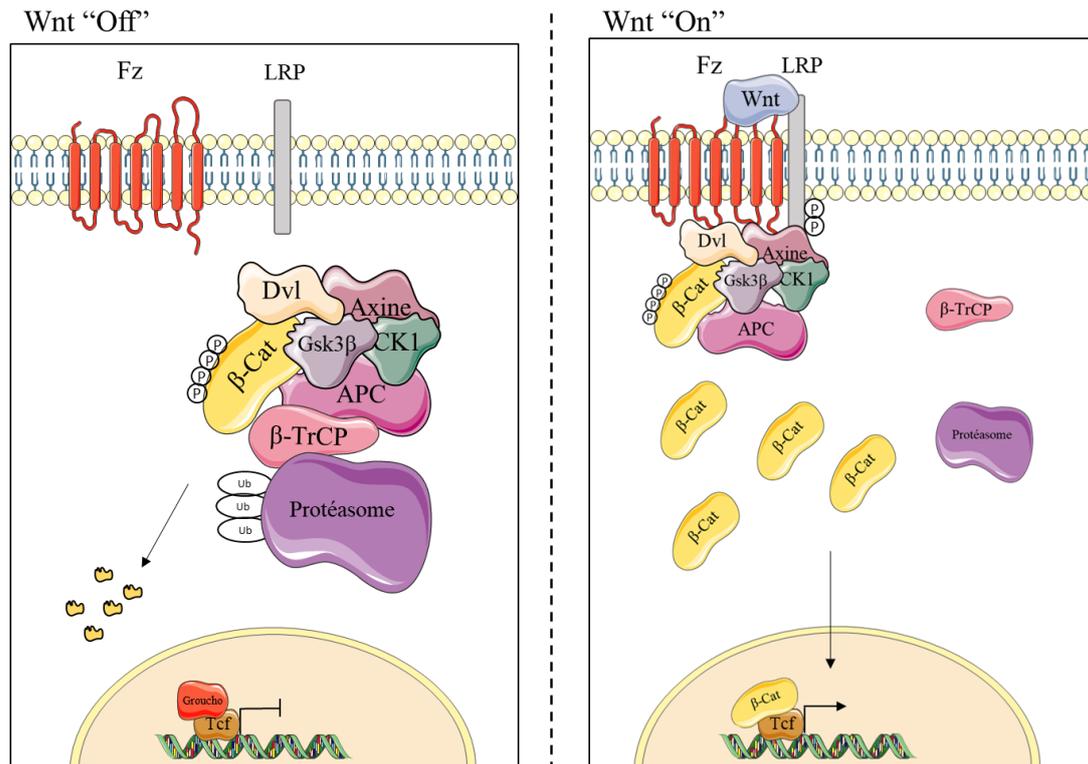


Figure 13 : Voie de signalisation Wnt

En absence de ligands Wnt, la β -caténine est séquestrée par le complexe APC/Axine et ubiquitinée par β -TrCP puis dégradée par le protéasome. La liaison de Wnt sur Frizzled et LRP5/6 inhibe le complexe de dégradation ce qui entraîne une accumulation de la β -caténine qui va être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs TCF/LEF et activer la transcription des gènes cibles de Wnt.

L'utilisation de nombreux modèles génétiques ou pharmacologiques modulant la signalisation Wnt a permis de mettre en évidence l'importance de cette voie dans la prolifération des cellules souches intestinales. En effet, la délétion de Tcf4, l'effecteur majeur de Wnt dans les cryptes intestinales, entraîne un défaut de développement des cryptes prolifératives (Korinek et al., 1998). De la même façon, la délétion de Tcf4 chez l'adulte, grâce à l'utilisation d'un mutant conditionnel, entraîne une rapide déplétion des CBC suivie d'une dégénération de l'épithélium intestinal, indiquant que Wnt n'est pas seulement nécessaire pour la mise en place de l'épithélium, mais est aussi requis pour le maintien de l'autorenouveau chez l'adulte (van Es et al., 2012a). Des phénotypes similaires ont été observés en cas de surexpression de Dickkopf1 (DKK1), un inhibiteur spécifique de LRP5/6, par transgène (Pinto et al., 2003) ou adénovirus (Kuhnert et al., 2004). Inversement, la sur-activation de la voie Wnt cause une hyper-prolifération des cryptes. La mutation du régulateur négatif de Wnt, APC, est la cause d'une forme héréditaire de cancer colorectaux appelé FAP (familial adenomatous polyposis) et 80% des cas sporadiques de cancers du côlon présentent une mutation d'APC

(Fearnhead et al., 2001). Enfin, le fait que Wnt joue un rôle essentiel dans la maintenance des cellules souches est également illustré par les niveaux de β -caténine nucléaire, qui sont plus élevés à la base des cryptes et diminuent progressivement le long de l'axe crypte/villosité (van de Wetering et al., 2002).

Les sources de Wnt dans la niche intestinale sont multiples. Au niveau de l'épithélium, Wnt est produit par les cellules de Paneth sous la forme de Wnt3 (Sato et al., 2011). La présence des cellules de Paneth augmente l'efficacité de formation organoïdes, et le Wnt3 dérivé des cellules de Paneth est suffisant pour maintenir ces organoïdes en culture si l'agoniste de Wnt, R-spondin, est ajouté au milieu (Sato et al., 2011). Le ligand Wnt3 produit par les cellules de Paneth agit via un court gradient décroissant s'étirant de la base vers le haut des cryptes. Du fait de sa faible solubilité, le ligand sécrété se lie sur les cellules les plus proches, les cellules Lgr5⁺, où il est retenu à la membrane par Frizzled. Lorsque les cellules se différencient et quittent le bas de la crypte, elles entraînent le Wnt3 lié à la surface qui se propage passivement par division des cellules souches, ce qui dilue le signal Wnt, créant ainsi un gradient (Farin et al., 2016). Les signaux Wnt sont également produits par les cellules du mésenchyme sous-jacent dont Wnt2b, Wnt4 et Wnt5a qui sont exprimés au niveau du stroma (Farin et al., 2012; Gregorieff et al., 2005) (décrit p.39).

Au niveau de la crypte, la signalisation Wnt est fortement renforcée par et est dépendante des R-spondins (décrites p.10). En effet, le blocage de R-spondins-2 et -3 par des anticorps monoclonaux entraîne une perte des CBC (Storm et al., 2016). De même, le KO pour les récepteurs Lgr4/5 cause un phénotype identique au KO Wnt et entraîne une perte rapide du compartiment prolifératif (de Lau et al., 2011). Les sources de R-spondins dans la niche restent encore à définir, cependant la R-spondin 3 est exprimée par les fibroblastes Fox11⁺ et la R-spondin-1 par une autre population mésenchymateuse identifiée par les marqueurs CD34⁺gp38⁺ α Sma⁻ (Stzepourginski et al., 2017).

L'activation de la voie Wnt joue donc un rôle crucial dans le contrôle de l'auto-renouvellement et le maintien des cellules souches, Wnt participe également au contrôle du positionnement des cellules le long de l'axe crypte/villosité via la régulation de l'expression du couple récepteur-ligand Eph/éphrine.

1.2. Signalisation Eph/éphrine

La signalisation entre les récepteurs Eph (Erythropoietin-Producing Hepatocellular) et leur ligands éphrines (Eph receptor-interacting) est médiée par contact direct cellule/cellule et induit une répulsion cellulaire. Cette signalisation est impliquée dans de nombreux processus, dont le contrôle du positionnement cellulaire au sein des tissus. Les ligands éphrines sont divisés en deux classes, A et B, selon leur structure et leur mode d'attachement à la membrane plasmique. Les récepteurs Eph constituent la plus grande sous famille de récepteurs tyrosine kinase et sont répartis en deux sous-classes, EphA et EphB, selon leur affinité pour les ligands éphrines A ou B (Merlos-Suarez and Batlle, 2008). Les récepteurs EphB2 et EphB3 sont des cibles de Tcf4 et sont exprimés dans le compartiment prolifératif, leur expression diminue progressivement le long de la crypte, l'expression d'EphB3 est restreinte à la base de la crypte. Inversement les signaux Wnt répriment l'expression des ligands éphrine B1 et B2 qui sont exprimés à la jonction crypte/villosité avec une expression décroissante vers le bas de la crypte. L'expression de éphrine B1 dans les cellules différenciées est également activée par la signalisation Notch (Koo et al., 2009). Ce gradient inverse d'interaction répulsive EphB2-B3/éphrines B1-B2 coordonne la migration et le positionnement cellulaire le long de l'axe crypte/villosité (Batlle et al., 2002). La délétion de EphB2 et EphB3 entraîne un défaut d'organisation de l'épithélium : les cellules de Paneth et les cellules prolifératives ne sont plus confinées dans la crypte et sont anormalement localisées le long de l'axe crypte/villosité, alors que les cellules différenciées exprimant éphrine B1 s'étendent jusqu'en bas des cryptes (Batlle et al., 2002). La signalisation EphB promeut également la prolifération des progéniteurs en favorisant la reprise du cycle cellulaire (Holmberg et al., 2006).

1.3. Signalisation BMP

Les BMP (Bone Morphogenetic Protein) sont des ligands extracellulaires appartenant à la famille TGF- β (Transforming Growth Factor- β). Les BMP initient la signalisation en se fixant sur leurs récepteurs de type II (BMPRII) ce qui permet l'assemblage d'un complexe hétérotétramérique composé de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II. Les deux types de récepteurs sont des protéines transmembranaires avec un domaine intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase. Suite à la formation du complexe, le récepteur de type II, qui est constitutivement actif, transphosphoryle le récepteur de type I conduisant à la phosphorylation des substrats R-Smads (receptor regulated Smad 1/5/8) par BMPRI. Les Smad1/5/8 phosphorylés lient ensuite leur co-médiateur Smad4, le complexe résultant transloque alors dans le noyau pour s'associer avec des co-répresseurs ou co-activateurs et

réguler l'expression de gènes cibles (Wang et al., 2014). Dans l'intestin, les principaux ligands, BMP2 et BMP4, sont sécrétés par les cellules mésenchymateuses au niveau des villosités (Haramis et al., 2004; Hardwick et al., 2004). La signalisation BMP inhibe la prolifération et favorise la différenciation des progéniteurs, la délétion du récepteur *Bmpr1a* (récepteur principal au niveau de l'épithélium intestinal) entraîne une hyper-prolifération et le développement de polypes (He et al., 2004). Il a été proposé que le rôle antiprolifératif de BMP soit médié par l'inhibition de la signalisation Wnt. En effet, les BMP sont capables d'inhiber l'accumulation nucléaire de β -caténine via l'inhibition de PTEN (He et al., 2004). Cependant, une étude récente a montré que l'effet des BMP est indépendant de la voie Wnt, mais est médiée directement par Smad4, qui recrute HDAC1 au niveau des promoteurs des gènes souches, comme *Lgr5* et *Sox9*, afin de réprimer leur transcription (Qi et al., 2017). Au niveau de la crypte la signalisation BMP est inhibée via la sécrétion d'antagonistes tel que *Gremlin1/2*, *Chordin-like 1* ou *Noggin* par les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes résidants dans le mésenchyme, créant ainsi un gradient d'activité croissante des BMP du bas vers le haut de la crypte (He et al., 2004; Kosinski et al., 2007).

1.4.Signalisation EGF

EGF (Epidermal Growth Factor) est un des composants nécessaires pour la culture des organoïdes (Sato et al., 2009). Le récepteur EGFR ou ERBB1 est un récepteur tyrosine kinase fortement exprimé par les CBC, le ligand EGF est produit par les cellules de Paneth (Sato et al., 2011). La liaison d'EGF sur son récepteur entraîne la dimérisation de celui-ci et stimule son activité tyrosine kinase et la transphosphorylation des domaines C-terminaux d'EGFR. Les effecteurs s'associent ensuite avec les tyrosines phosphorylées via leurs domaines SH2, ce qui initie diverses cascades de signalisation (Jorissen et al., 2003; Wee and Wang, 2017). L'activation d'EGFR permet le recrutement et l'activation de PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) qui va convertir le PIP2 en PIP3. Le PIP3 sert alors de site d'ancrage et d'activation pour Akt. Akt est une serine/thréonine kinase possédant de multiples substrats. La phosphorylation de GSK3 β ou FOXO1 inhibe leur activité alors que celle de mTORC1 est activatrice et résulte en une stimulation de la prolifération et de la croissance cellulaire. Akt a également un rôle anti-apoptotique via l'inhibition de BAD (Bcl-2-associated death promoter). EGFR peut également activer les voies MAPK (mitogen activated protein kinase) ou JAK/STAT (Janus Kinase) (Wee and Wang, 2017). La signalisation EGF stimule donc la prolifération des cellules souches intestinales, et son blocage entraîne une quiescence des CBC (Basak et al., 2017). Afin de réguler cette signalisation pro-proliférative et donc pro-

cancéreuse, les cellules souches co-expriment Lrig1, une protéine transmembranaire qui inhibe EGFR et favorise son ubiquitination exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif de la signalisation EGF (Laederich et al., 2004). Les souris Lrig1 KO présentent une hyper-prolifération et une expansion des cryptes due à une augmentation de la signalisation EGF (Wong et al., 2012) confirmant donc le rôle pro-mitotique d'EGF dans la crypte intestinale.

1.5.Signalisation Notch

La signalisation Notch joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération des cellules souches intestinales mais également dans la détermination entre le lignage sécréteur ou absorbant au cours de la différenciation. La signalisation Notch nécessite un contact direct entre une cellule qui exprime le ligand transmembranaire (Dll1- 4 ou Jagged 1) et une cellule qui exprime le récepteur Notch1- 4. La fixation du ligand sur le récepteur entraîne deux clivages protéolytiques du récepteur Notch : la métalloprotéase ADAM10 clive la partie extracellulaire puis la partie intracellulaire est clivée par le complexe γ -sécrétase, ce qui aboutit au relargage de la partie intracellulaire NICD (Notch Intra-Cellular Domain) dans le cytoplasme. Ce fragment actif NICD transloque dans le noyau et interagit avec le facteur de transcription RBPJ κ (aussi appelé CSL) afin d'activer l'expression de gènes cibles (Bray, 2006). L'effet principal de Notch est d'induire l'expression du répresseur transcriptionnel Hes1 (hairly enhancer of split) qui à son tour inhibe l'expression d'Atoh1 (aussi connu le nom de Math1), un facteur de transcription ayant pour cible les ligands Notch Dll1 et Dll4. (Fre et al., 2005; Lo et al., 2017). La signalisation Notch aboutit donc à la perte d'expression de ses ligands. Ce mécanisme, connu sous le nom d'inhibition latérale, permet d'amplifier et de stabiliser la différence de signalisation Notch et donc de renforcer la différence d'identité entre deux cellules (Sancho et al., 2015) (Figure 14).

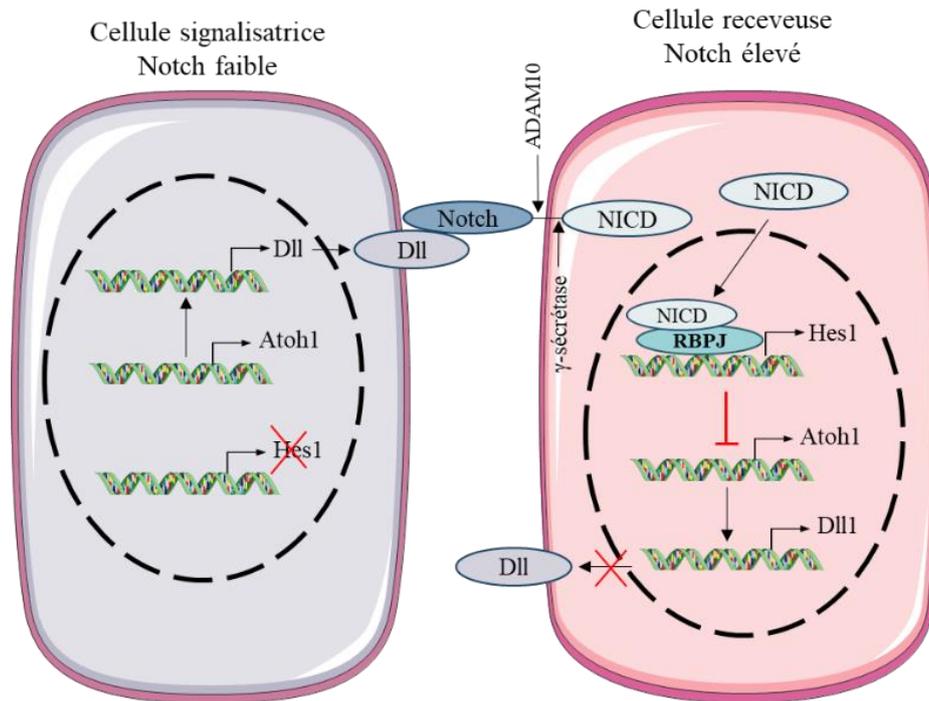


Figure 14 : Signalisation Notch et l'inhibition latérale

Suite à la liaison du ligand Dll sur le récepteur Notch, deux étapes de clivage successives entraînent la libération de la partie intracellulaire NICD dans le cytoplasme. NICD va alors se relocaliser dans le noyau et interagir avec RBPJk pour stimuler la transcription de Hes1. Hes1 est un répresseur transcriptionnel qui inhibe l'expression de Atoh1 et des ligands Dll. L'activation de Notch entraîne donc la répression de ses ligands, par conséquent une cellule avec une faible activité Notch produit plus de ligands. Inversement, une cellule avec une forte activité Notch exprime peu de ligand à sa surface, ce qui renforce la production de ligand par les cellules adjacentes puisqu'elles ne reçoivent pas de signalisation inhibitrice. Ce mécanisme d'autorégulation, appelé inhibition latérale, permet d'amplifier la différence de signalisation Notch entre deux cellules et donc l'engagement dans des voies de différenciations opposées. D'après Sancho et al. 2015

Dans la crypte intestinale, les CBC expriment Notch 1 et 2 (Fre et al., 2011) alors que les ligands Dll4 et Dll1 sont exprimés par les cellules de Paneth adjacentes (Sato et al., 2011) et les progéniteurs sécréteurs (van Es et al., 2012b). La signalisation Notch favorise la prolifération des cellules souches et la différenciation vers le lignage absorbant. En effet, son inhibition, via la délétion des récepteurs Notch1/2 ou de leur ligands Dll1/4, entraîne une conversion des cellules prolifératives en cellules sécrétrices post-mitotiques (Pellegrinet et al., 2011; Riccio et al., 2008). La régulation de la balance entre les lignages sécréteur et absorbant est dépendante de l'inhibition d'Atoh1 (van Es et al., 2010), qui contrôle la différenciation vers le lignage sécréteur. La délétion d'Atoh1 entraîne une perte des cellules sécrétrices (Yang et al., 2001), inversement sa surexpression dirige la différenciation vers le lignage sécréteur (VanDussen and Samuelson, 2010). L'inhibition de Notch entraîne également une déplétion des cellules souches indiquant donc que sa signalisation est requise pour le maintien et la

prolifération des CBC. Cet effet est indépendant d'Atoh1 et est médié par la répression des inhibiteurs de CDK p27^{Kip1} et p57^{Kip2} directement par Hes1 (Riccio et al., 2008). Notch est également capable de stimuler via RBPJ κ l'expression de gènes souches dont *Olfm4* (VanDussen et al., 2012). Dans l'épiderme, il a été montré que Notch joue un rôle important dans la régulation d'Ascl2 : Hes1 est capable d'inhiber Ascl2 afin d'éviter une différenciation précoce, alors que NICD et RBPJ κ se fixent sur le promoteur d'Ascl2 afin d'activer sa transcription (Moriyama et al., 2008). La signalisation Notch est également renforcée par les signaux Wnt puisque la β -caténine peut se lier au complexe NICD/RBPJ κ pour augmenter la transcription de gènes cibles, dont Hes1 (Yamamizu et al., 2010). Enfin, il a été proposé que Notch permette de réguler la balance entre les 2 types de cellules souches, proliférative ou quiescente, en favorisant la division asymétrique de celles-ci (Srinivasan et al., 2016).

En conclusion, Notch régule différents aspects de l'homéostasie intestinale en favorisant à la fois la prolifération des cellules souches et en régulant la différenciation et la balance entre les différents lignages.

1.6. Signalisation Hippo

La signalisation Hippo est hautement conservée au cours de l'évolution et joue un rôle crucial dans la régulation de la taille des organes, le maintien des cellules souches et la régénération via l'intégration de multiples signaux dont la perception des forces mécaniques de la matrice extracellulaire, l'activation de récepteurs tyrosine kinase ou encore le stress métabolique. Tous ces signaux convergent vers l'activation des kinases Mst1/2 (mammalian Ste20-like kinase 1/2), homologues de Hippo chez la drosophile, qui phosphorylent et activent les protéines kinases LATS1/2 (Large Tumor Suppressor kinase 1/2) ainsi que les protéines scaffold SAV1 (salvador homologue 1) et MOB1 (mops one binder 1). A son tour, LATS phosphoryle les régulateurs transcriptionnel YAP (Yes associated protein) et TAZ, ce qui entraîne leur séquestration cytoplasmique et leur inactivation. En absence de signalisation les cofacteurs YAP/TAZ se fixent sur les facteurs de transcription TEAD (TEA Domain family Member 1-4) et induisent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire (Hong et al., 2016). Dans l'intestin YAP est nucléaire au bas des cryptes et cytoplasmique dans les villosités, indiquant donc un gradient croissant vers les villosités de la signalisation Hippo (Barry et al., 2013).

Le rôle de YAP/TAZ dans l'homéostasie intestinale est controversé. Plusieurs études ont rapporté un rôle pro-prolifératif de YAP dans les cellules souches intestinales. Une sur-

activation de YAP, soit via l'inhibition de Mst1/2, soit directement par transgène, entraîne une hyperplasie des cryptes intestinales et une expansion du compartiment souche (Camargo et al., 2007; Zhou et al., 2011). Inversement, une étude a montré que la surexpression d'un mutant nucléaire YAP^{S127A} entraîne une déplétion des CBC, ce qui suggère un rôle antiprolifératif de YAP dans les cellules souches intestinales (Barry et al., 2013). Cette incohérence peut s'expliquer par des fonctions différentes de YAP suivant sa localisation nucléaire ou cytoplasmique. D'autres études ont également montré que la délétion de YAP en homéostasie n'entraîne pas d'effet (Zhou et al., 2011), qui pourrait s'expliquer par le rôle redondant des protéines YAP et TAZ, puisque le double KO entraîne un défaut de prolifération des cryptes (Imajo et al., 2015), ce qui est consistant avec les études rapportant un rôle pro-prolifératif de YAP.

Même si le rôle de YAP reste à investiguer dans le tissu sain, son rôle dans la régénération est bien établi et son activité est requise pour la réponse aux dommages. Suite à un traitement chimique DSS (Dextran Sodium Sulfate) ou à une irradiation, une forte augmentation de l'expression YAP est observée pendant la phase de régénération, et sa délétion entraîne un défaut de régénération (Cai et al., 2010; Gregorieff et al., 2015). Pendant la phase précoce de régénération, YAP protège le pool de CBC grâce à l'inhibition de la signalisation Wnt en faveur d'une augmentation de la signalisation EGF via la transcription de Ereg, un ligand de EGFR (Gregorieff et al., 2015). Il a également été montré que l'activation de Yap permet l'expansion des cellules souches Clu⁺, permettant ainsi la régénération de l'épithélium (Ayyaz et al., 2019). Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés pour expliquer la régulation de Wnt par YAP suivant sa localisation intracellulaire. La fraction nucléaire de YAP/TAZ peut activer Wnt, ce qui promeut la prolifération et la maintenance des cellules souches (Camargo et al., 2007; Zhou et al., 2011). Inversement la fraction cytoplasmique peut inhiber la signalisation Wnt via l'interaction avec Dvl (Barry et al., 2013; Varelas et al., 2010). Il a également été montré que YAP/TAZ peut lier directement l'Axine et participer au recrutement de β -TrCP facilitant donc la dégradation de β -caténine. L'activation de Wnt entraîne la libération de YAP/TAZ du complexe de dégradation ce qui promeut à la fois la stabilisation de β -caténine et la translocation nucléaire de YAP/TAZ (Azzolin et al., 2014). YAP régule également positivement la voie Notch et la délétion de Mst1 et Mst2 entraîne une augmentation de l'expression de NICD nucléaire et Hes1 (Zhou et al., 2011). Le mécanisme reste à élucider au niveau de l'intestin, cependant il a été montré dans les hépatocytes que Notch2 est une cible directe du complexe YAP/TEAD (Yimlamai et al., 2014).

En conclusion, l'ensemble de ces voies de signalisation joue un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération des cellules souches intestinales. Leurs régulations et les échanges entre ces différents signaux permettent de maintenir la balance entre auto-renouveau et différenciation des cellules épithéliales intestinales (**Figures 15, 16**).

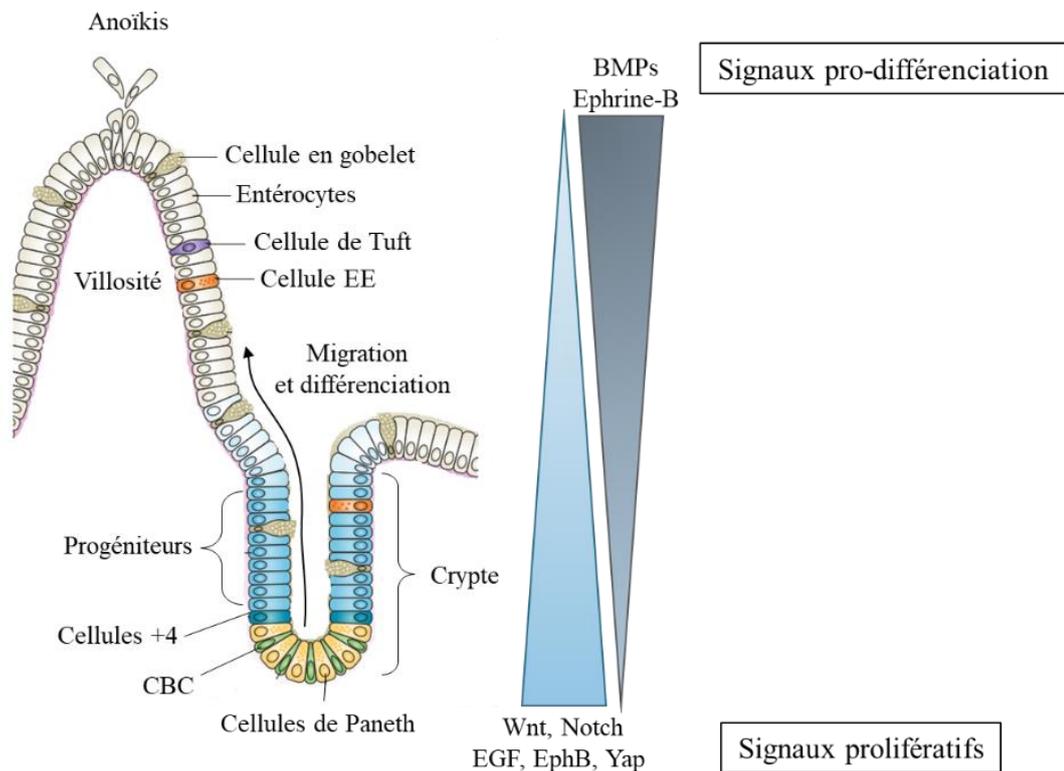


Figure 15 : Gradients inverses de facteurs de croissance

La balance entre prolifération et différenciation est maintenue grâce aux différentes voies de signalisation. La présence de signaux Wnt, Notch, EGF, ou encore YAP au niveau de la crypte stimule la prolifération des cellules souches. A contrario, la présence de signaux BMP dans les villosités promeut la différenciation. La localisation des différents types cellulaires est régulée par la présence de gradients inverses de répulsion EphB/Ephrines. D'après N.Barker, 2014

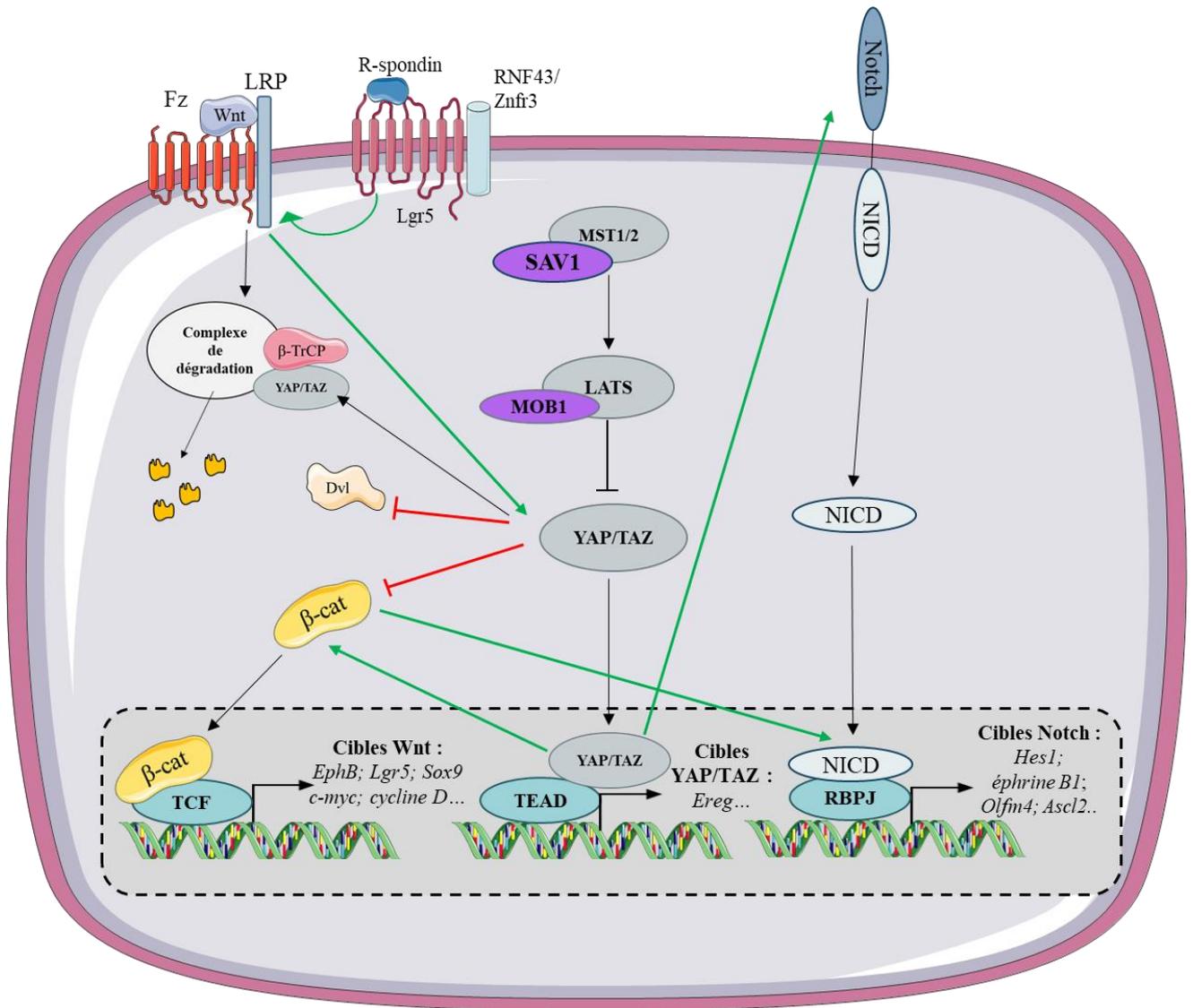


Figure 16 : Interconnexion entre les différentes voies de signalisation

L'homéostasie tissulaire est régulée grâce à l'équilibre entre les différents signaux émanant de la niche. L'interconnexion entre ces différentes voies de signalisation permet de coordonner et synchroniser leur effet. La voie de signalisation Wnt, qui est renforcée par les R-spondins sécrétées au niveau du mésenchyme, régule positivement la signalisation Notch, ainsi que l'expression des récepteur EphB et la translocation nucléaire de YAP/TAZ. Les facteurs YAP/TAZ ont des rôles antagonistes suivant leur localisation subcellulaire. Lorsque la signalisation Hippo est activée, YAP/TAZ est séquestré dans le cytoplasme où il inhibe la voie Wnt via son interaction avec Dvl et le recrutement de β -TrCP au complexe de dégradation de β -caténine. Inversement lorsque la voie Hippo est éteinte, YAP/TAZ devient nucléaire ce qui entraîne une stabilisation de la β -caténine via un mécanisme inconnu, YAP nucléaire va également stimuler la signalisation EGF et Notch via la transcription du ligand Ereg et du récepteur Notch2, respectivement. L'activation de la voie Notch stimule l'expression du ligand éphrine B1 et participe ainsi de manière indirecte au contrôle de la migration des cellules épithéliales.

2. La niche épithéliale : les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont des cellules sécrétrices, localisées en bas de la crypte, intercalées entre les CBC. A l'inverse des autres types cellulaires, les cellules de Paneth migrent vers le bas des cryptes après différenciation et ont une durée de vie de 3 semaines. Cette migration spécifique est dépendante de EphB3 (Batlle et al., 2002). Les cellules de Paneth jouent un rôle dans l'immunité innée via la sécrétion de nombreux peptides antimicrobiens tels que le lysozyme, α -défensine ou encore phospholipase A2 (Ouellette, 2010). La sécrétion de ces peptides permet la protection des cellules souches mais participe également à l'immunité de la muqueuse et à la composition du microbiote (Salzman et al., 2010). Dans le colon, où les cellules de Paneth sont absentes, leur fonction est assurée par un type cellulaire similaire, les cellules sécrétrices REG4⁺ (Regenerating family member 4) (Sasaki et al., 2016). En bas de la crypte, chaque cellule souche est en contact avec au moins une cellule de Paneth. Le positionnement des cellules de Paneth a un rôle critique dans l'établissement des cryptes post-natales et dans la fission des cryptes. L'expansion des cryptes est déclenchée par un réarrangement des CBC et des cellules de Paneth qui entraîne la formation de cluster de CBC entouré de deux groupes de cellules de Paneth (Langlands et al., 2016). De plus, la position des CBC par rapport aux cellules de Paneth influe également sur leur maintenance. En effet, de l'imagerie *in vivo* a permis de mettre en évidence que les CBC résidant au centre de la crypte, et donc entourées de deux Paneth, ont plus de chance de devenir le clone dominant par rapport aux CBC qui se situent en périphérie et qui ne sont donc en contact qu'avec une seule Paneth (Ritsma et al., 2014). Les cellules de Paneth fournissent des signaux essentiels aux cellules souches. Elles sécrètent Wnt3a, EGF et expriment les ligands de Notch Dll1 et Dll4 qui sont des éléments cruciaux dans la maintenance des cellules souches (Sato et al., 2011). Cependant, la délétion de Wnt3a (Farin et al., 2012) ou de Porcupine (Kabiri et al., 2014) spécifiquement dans l'épithélium intestinal n'entraîne aucun effet. De la même façon, l'absence de cellules de Paneth n'altère pas la maintenance ou la prolifération des cellules souches intestinales (Durand et al., 2012; Kim et al., 2012b), ce qui indique donc qu'il existe une source redondante de ces signaux dans la niche intestinale, et notamment au niveau du mésenchyme.

3. Niche mésenchymateuse

Les cellules de la crypte sont entourées et influencées par le stroma qui est composé de nombreuses cellules mésenchymateuses : les fibroblastes, les myofibroblastes, les péricytes, les cellules musculaires, les cellules immunitaires ou encore les cellules du système nerveux entérique.

L'intégrité de l'épithélium est dépendant de la présence de ce mésenchyme, notamment à cause de la sécrétion de différents ligands Wnt. Ainsi, les cellules mésenchymateuses purifiées et cultivées avec des cryptes intestinales déficientes en Wnt3 sont capables de soutenir la formation d'organoïdes (Farin et al., 2012). Plusieurs types cellulaires ont été identifiés comme source de Wnt, dont les cellules Foxl1⁺. Ces cellules représentent une sous-population de fibroblastes appelé télocytes bordant l'épithélium et exprimant Wnt2b, Wnt5a et Rspo3, ainsi que les inhibiteurs de BMP : Gremlin 1 et 2. La délétion conditionnelle de ces télocytes cause une perte des CBC (Aoki et al., 2016). Cet effet est principalement médié par la voie Wnt puisque le blocage de la sécrétion de Wnt par les télocytes entraîne un phénotype similaire (Shoshkes-Carmel et al., 2018). D'autres sous-populations ont été identifiées comme source de Wnt, notamment les cellules Gli1⁺ qui expriment fortement Wnt2b (Valenta et al., 2016). L'inhibition de sécrétion de Wnt dans les cellules Gli1⁺ entraîne un défaut d'auto-renouvellement des cellules Lgr5⁺ au niveau du colon. Cependant, cette déplétion n'a pas d'effet au niveau de l'intestin, probablement grâce à la compensation de la sécrétion de Wnt3 par les cellules de Paneth (Degirmenci et al., 2018). Enfin, une étude a identifié les cellules CD34⁺gp38⁺ comme source de Wnt2b, R-spondin1 et Gremlin1. Les cellules CD34⁺gp38⁺ sont suffisantes pour supporter la croissance des CBC *in vitro* en absence de Wnt ou R-spondin. Ces cellules expriment également Foxl1⁺, ce qui suggère une possible relation entre ces deux populations mésenchymateuses (Stzpourginski et al., 2017). Cet effet pro-prolifératif des ligands est renforcé par la sécrétion des inhibiteurs de BMPs, Gremlin 1/2 et Chordin-like 1, par les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses (Kosinski et al., 2007).

La couche musculaire lisse assure le péristaltisme permettant la progression du bol alimentaire le long du tractus digestif. Ces mouvements sont coordonnés par les neurones et cellules gliales du système nerveux entérique. Les neurones entériques de la niche stimulent la croissance et la régénération de l'épithélium et répondent au GLP2 (Glucagon Like Peptide 2) sécrété par les cellules épithéliales en transmettant en retour un signal à l'épithélium (Bjerknes and Cheng, 2001). Les cellules gliales, quant à elles, produisent de nombreux facteurs dont le

GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor) ou le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) qui ont respectivement des rôles anti-apoptotique et anti-prolifératif sur l'épithélium intestinal (Neunlist et al., 2007; Steinkamp et al., 2003). Les cellules immunitaires contribuent également à la protection de l'épithélium en cas de dommages, notamment via la sécrétion d'interleukine-22 (IL-22) par les cellules lymphoïdes. En effet, un traitement à l'IL-22 après dommages favorise la régénération des CBC (Lindemans et al., 2015). De plus, les macrophages ont été identifiés comme source de Wnt, et en cas de dommage, la perte de sécrétion de Wnt par les macrophages cause un défaut de régénération (Saha et al., 2016).

Les fibroblastes fournissent aussi un support structural aux cellules épithéliales via la synthèse de la matrice extracellulaire, cette dernière exerce également un rôle important dans l'homéostasie des cellules épithéliales de par ses propriétés biochimiques et mécaniques.

4. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est principalement composée de laminine, collagène et fibronectine et sa composition change le long de l'axe crypte/villosité (Meran et al., 2017). Alors que le collagène de type IV est uniformément réparti dans la matrice du tissu intestinal (Beaulieu, 1992; Groulx et al., 2011), différents sous-types de laminines sont spécifiquement distribués selon le compartiment : la laminine α 2 est enrichie au niveau des cryptes alors que les laminines α 3 et α 5 sont présentes dans les villosités (Teller and Beaulieu, 2001). La laminine α 5 joue un rôle important dans la maintenance de la muqueuse et de l'architecture de l'épithélium démontrant qu'il existe un lien entre la composition de la matrice et la différenciation cellulaire (Mahoney et al., 2008). D'autres protéines de la matrice sont régionalement distribuées, notamment la fibronectine qui est enrichie au niveau des cryptes (Beaulieu, 1992). Des défauts de dépôt de fibronectine sont corrélés avec de nombreuses pathologies, par exemple, une augmentation de fibronectine dans les cellules épithéliales est associée à une fibrose dans des pathologies inflammatoires tel que les colites. La fibronectine induit l'expression et l'activation de la voie NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), ce qui promeut l'adhésion cellulaire et la migration, suggérant que la fibronectine joue un rôle important dans la réparation tissulaire (Kolachala et al., 2007). Il a également été montré *in vitro* que la fibronectine stimule la migration et la prolifération des cellules intestinales (Gagne et al., 2010).

Les protéines de la matrice interagissent avec les intégrines situées à la surface des cellules épithéliales, ce qui permet l'ancrage des cellules à la matrice et le lien avec le cytosquelette

intracellulaire. Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires formées d'une chaîne α et d'une chaîne β . Dans l'intestin, la liaison spécifique aux protéines de la matrice est principalement médiée par les intégrines $\beta 1$ et $\beta 4$. Les intégrines $\beta 1$ sont exprimées uniformément le long de l'axe crypte/villosité alors que certaines sous-unités α sont régionalement distribuées avec la chaîne $\alpha 2$ principalement exprimée au niveau des cryptes et la chaîne $\alpha 3$ enrichie dans les villosités (Beaulieu, 1992; Teller and Beaulieu, 2001). Les intégrines $\beta 1$ jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération des cellules souches intestinales via un mécanisme dépendant de Shh (Jones et al., 2006). L'intégrine $\alpha 8\beta 1$ est également un acteur important de la relation cellule/matrice au niveau intestinal et son expression est restreinte aux cellules de la crypte dans l'intestin fœtal humain. L'intégrine $\alpha 8\beta 1$ interagit avec un motif RGD, ce qui active la voie RhoA, entraînant la formation de point focaux d'adhésion et de fibres de stress ce qui augmente l'adhésion et la prolifération et diminue la migration cellulaire (Benoit et al., 2009).

En addition à ces signaux biochimiques, la matrice transmet également des informations mécaniques aux cellules épithéliales, notamment via la signalisation Hippo qui est une voie clé dans la mécano-transduction. Une étude basée sur l'utilisation d'une matrice synthétique définie pour la culture d'organoïdes a permis de confirmer l'importance de ces forces mécaniques dans la biologie des cellules souches intestinales. Par l'utilisation d'hydrogel à base de PEG (Poly(Ethylène)Glycol), il a été montré qu'une rigidité importante (1,3 kPa) favorise l'expansion des cellules souche via l'activation de YAP alors que des matrices moins rigides (190 Pa) sont nécessaires pour la différenciation et donc la formation des organoïdes (Gjorevski et al., 2016).

Toutes ces études montrent donc l'importance de la composition biochimique mais aussi des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire dans l'homéostasie tissulaire. La matrice joue également un rôle important dans la régénération. Au cours de la régénération, un remodelage de la matrice et une forte augmentation de collagène 1 induit l'activation de Yap, ce qui aboutit à une reprogrammation cellulaire et une régénération efficace (Yui et al., 2018).

En conclusion, le microenvironnement intestinal est très complexe et composé de nombreux acteurs cellulaires (épithéliaux ou mésenchymateux) et physiques (matrice extracellulaire). L'équilibre entre les différents signaux fournis par ce microenvironnement permet de coordonner l'autorenouveaulement des cellules souches, la prolifération et la localisation des progéniteurs ainsi que leur différenciation (**Figure 17**).

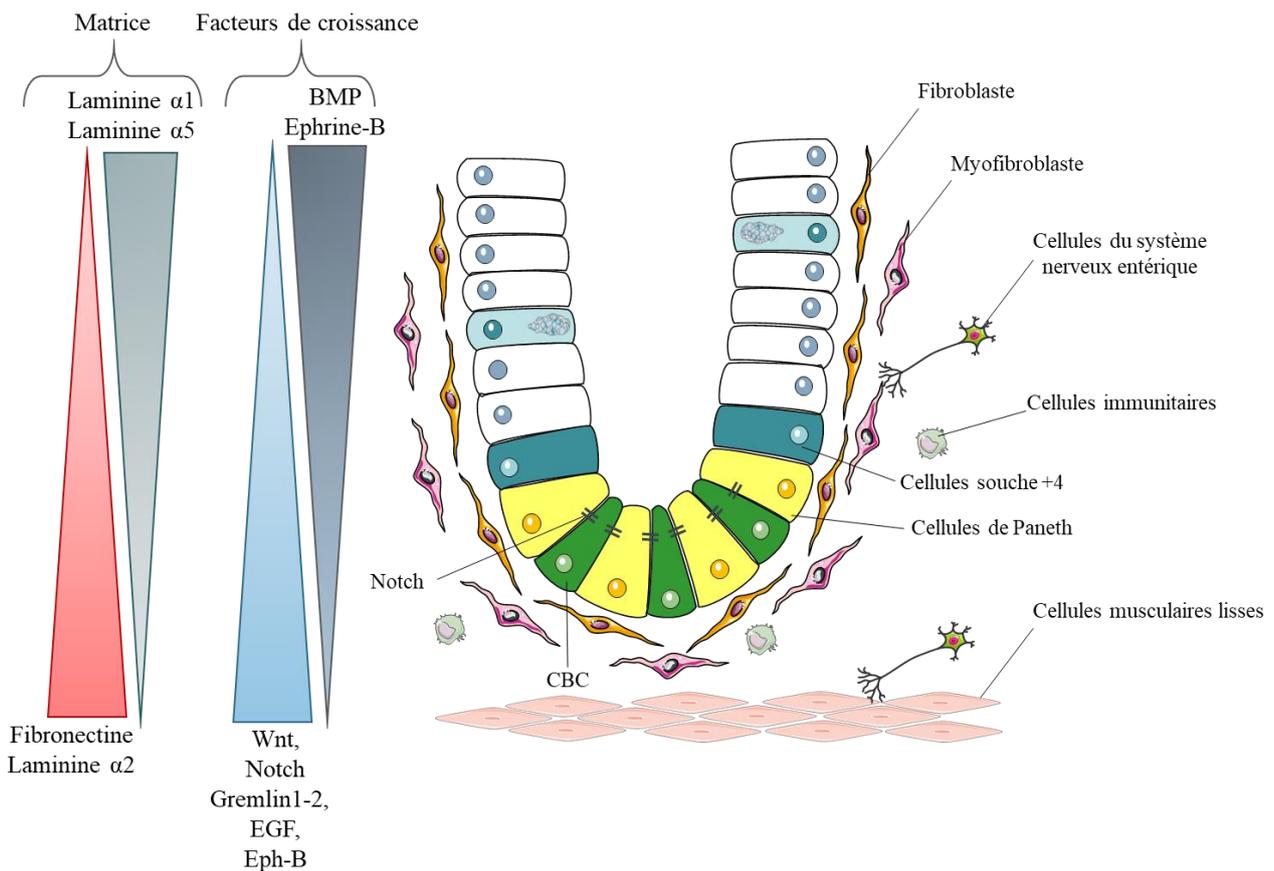


Figure 17 : Microenvironnement des cellules souches intestinales

La balance entre prolifération et différenciation est finement régulée grâce à l'équilibre des différents signaux de la niche. A la base de la crypte, les cellules de Paneth et les cellules mésenchymateuses sécrètent les signaux prolifératifs Wnt, R-spondin et EGF. Un gradient d'activité croissante de BMP existe en opposition à ce gradient Wnt. Les cellules mésenchymateuses sécrètent des BMP ce qui promeut l'engagement dans la différenciation. Afin de protéger les cellules souches de ces BMP, les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses sécrètent les inhibiteurs de BMP, Gremlin 1/2 ou Chordin-like 1. D'autres éléments cellulaires jouent également un rôle important, notamment les cellules du système nerveux entérique ou encore les cellules immunitaires. La niche physique est principalement composée de collagène, fibronectine et laminine, et la concentration de ces protéines varie le long de l'axe crypte villosité créant un gradient de matrice extracellulaire. Tous ces acteurs communiquent entre eux et avec les cellules épithéliales afin de maintenir l'intégrité tissulaire.

V. Lignages et différenciation

Une fois sortie de la base de la crypte, les cellules filles des CBC entrent dans le compartiment des progéniteurs, appelés « Transit Amplifying cells » ou TA. Les TA restent environ 2 jours dans la crypte, où elles subissent 4 à 5 divisions, avant de se différencier en un type cellulaire mature et d'entrer dans les villosités (van der Flier and Clevers, 2009). La maturation commence dès que les cellules quittent la zone des cellules souches, les cellules s'engagent alors soit vers le lignage sécréteur, soit vers le lignage absorbif. Cette décision dépend de la présence ou non de signaux Notch, (décrit p.32) (Sancho et al., 2015).

1. Lignage sécréteur

1.1. Les cellules de Paneth

Comme discuté précédemment les cellules de Paneth représentent la niche épithéliale des cellules souches. Elles apparaissent environ deux semaines après la naissance, cependant la présence de cryptdine, un peptide antimicrobien sécrété par les cellules de Paneth, est visible dès le stade embryonnaire E14.5. La maturation des cellules de Paneth nécessite la présence de signaux Wnt (van Es et al., 2005) et FGF (Vidrich et al., 2009) ainsi que l'expression du facteur de transcription cible de Wnt, Sox9 (Mori-Akiyama et al., 2007). Les facteurs de transcription *Gfi1* (Growth Factor Independent 1) et *Spdef* jouent un rôle important dans la différenciation des progéniteurs sécréteurs en cellules de Paneth et cellules en gobelet. *Gfi1* est induit par l'expression d'*Atoh1* et est nécessaire pour déterminer la balance entre les lignages gobelet/Paneth versus entéroendocrine. En effet, les animaux *Gfi1*^{-/-} présentent une absence de cellules de Paneth et une réduction du nombre de cellules en gobelet, en faveur d'une forte augmentation du nombre de cellules entéroendocrines (Shroyer et al., 2005). *Spdef* est une cible de Wnt, il contrôle l'expression de certains marqueurs, dont la cryptdine, et son expression permet la maturation terminale des cellules de Paneth et gobelet. De la même manière que *Gfi1*, sa délétion entraîne l'accumulation de progéniteurs sécréteurs immatures (Gregorieff et al., 2009). Le choix entre Paneth et gobelet est ensuite déterminé par la tyrosine phosphatase Shp2 via l'activation de la voie MAPK. La délétion de Shp2, qui cause une diminution de la signalisation MAPK, entraîne une augmentation de nombre de cellules de Paneth au dépend des cellules en gobelet. Inversement l'activation constitutive de MAPK cause le phénotype inverse (Heuberger et al., 2014).

1.2. Les cellules en gobelet

La proportion des cellules en gobelet (Goblet), aussi appelée cellules caliciformes ou cellules à mucus, augmente le long de l'épithélium de 4% au niveau du duodénum jusqu'à environ 16% dans le colon. Ce sont des cellules exocrines responsables de la production et de la sécrétion de la barrière protectrice de mucus, principalement constituée de mucines, qui tapisse la face luminal de l'épithélium intestinal (Kim and Ho, 2010). Les cellules en gobelet sont caractérisées par la présence de vésicules de sécrétion donnant une forme évasée au pôle apical. L'expression d'Atoh1 stimule l'induction de Muc2, mucine principale de ces cellules, en se fixant directement sur le promoteur de *Muc2* (Park et al., 2006). La maturation terminale des cellules en gobelet nécessite ensuite l'activation du facteur de transcription *Klf4* (Katz et al., 2002). La production des cellules en gobelet est également stimulée par les interleukines IL-4 et IL-13 produites en réponse à l'activation des cellules de Tuft dans la réponse immunitaire de type 2 (Gerbe et al., 2016; von Moltke et al., 2016).

1.3. Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines représentent moins de 1% des cellules de l'épithélium. Ce sont des cellules sécrétrices qui, en cas de stimulation, vont sécréter une grande variété d'hormones dans la circulation sanguine pour réguler la satiété, la motilité, l'immunité et l'inflammation. Il existe une quinzaine de sous-type de cellules entéroendocrines en fonction des hormones sécrétées (Gunawardene et al., 2011). Le déterminant principal de leur différenciation est le facteur de transcription *Ngn3* (*Neurogénine 3*). *Ngn3* est un facteur de transcription bHLH, activé en aval d'Atoh1 et sa délétion cause une perte totale des cellules entéroendocrines dans l'épithélium (Jenny et al., 2002). *Gfi1* inhibe l'expression de *Ngn3* et favorise donc la différenciation vers le lignage Paneth/gobelet (Bjerknes and Cheng, 2010). L'expression de facteurs spécifiques est ensuite nécessaire à l'expression des différentes hormones, par exemple le facteur de transcription NeuroD est requis pour la maturation des cellules entéroendocrines sécrétrices de sécrétine et cholécystokinine (Naya et al., 1997).

1.4. Les cellules de Tuft

Les cellules de Tuft représentent une très faible proportion des cellules épithéliales intestinales et ont une morphologie particulière caractérisée par une bordure en brosse très développée dans la région apicale (Gerbe et al., 2012). Ces cellules sont impliquées dans la réponse immunitaire de type 2 induite par une infection parasitaire via la sécrétion d'IL-25. Cette sécrétion d'IL-25, entraîne la sécrétion de IL-4 et IL-13 par les cellules immunitaires, ce

qui stimule la production des cellules de Tuft (Gerbe et al., 2016; von Moltke et al., 2016). L'importance d'Atoh1 pour la différenciation vers le lignage Tuft est controversée, une étude a montré l'absence de cellules de Tuft dans les souris Atoh1^{-/-} (Gerbe et al., 2011) alors qu'une deuxième étude contredit ces observations et rapporte une augmentation du nombre de cellules de Tuft en absence d'Atoh1 (Bjerknes et al., 2012). Plus récemment, *Pou2f3* a été identifié comme un facteur de transcription spécifiquement requis pour la différenciation des cellules de Tuft (Gerbe et al., 2016).

2. Lignage absorptif

2.1. Les entérocytes

Les entérocytes représentent la majorité des cellules épithéliales de l'intestin (environ 80%), et sont caractérisés par une bordure en brosse formée de microvillosités qui se projettent dans la lumière du tube digestif et participant ainsi à l'augmentation de la surface d'échange. Les entérocytes sont responsables de l'absorption des nutriments vers les vaisseaux sanguins et lymphatiques (van der Flier and Clevers, 2009). L'engagement vers la voie absorptive est initié par la voie Notch, puis différents facteurs de transcription permettent ensuite l'expression de gènes impliqués dans la différenciation dont les facteurs HNF4 (Hepatocyte Nuclear factor 4) (Chen et al., 2019), HNF1- α (Hepatocyte Nuclear Factor-1 α), CDX2 (Caudal Type Homeobox 2) ou GATA-4. Ces facteurs de transcription coopèrent pour permettre l'arrêt du cycle cellulaire et l'acquisition de marqueurs structuraux et fonctionnels des entérocytes (Benoit et al., 2010). HNF4 est induit par la voie BMP/Smad et permet de stabiliser le lignage entérocyte via la formation d'une boucle de régulation positive dans laquelle HNF4 et BMP/Smad s'activent réciproquement (Chen et al., 2019).

2.2. Les cellules M

Les cellules M, ou cellules à microplis, sont des cellules spécialisées recouvrant les plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont des follicules lymphoïdes contenant des lymphocytes B, T et des cellules mononucléées. Les cellules M participent à la réponse immunitaire en reconnaissant les antigènes présents dans la lumière intestinale et en les transportant vers les lymphocytes sous-jacents (Mabbott et al., 2013). Les cellules M sont générées lorsque les entérocytes, qui expriment RANK (receptor activator of nuclear factor κ -B), rencontrent le ligand RANKL, spécifiquement exprimé par les cellules stromales au niveau des follicules

(Knoop et al., 2009). L'activation de RANK par RANKL induit l'expression de SpiB, un facteur de transcription requis pour la maturation des cellules M (Kanaya et al., 2012).

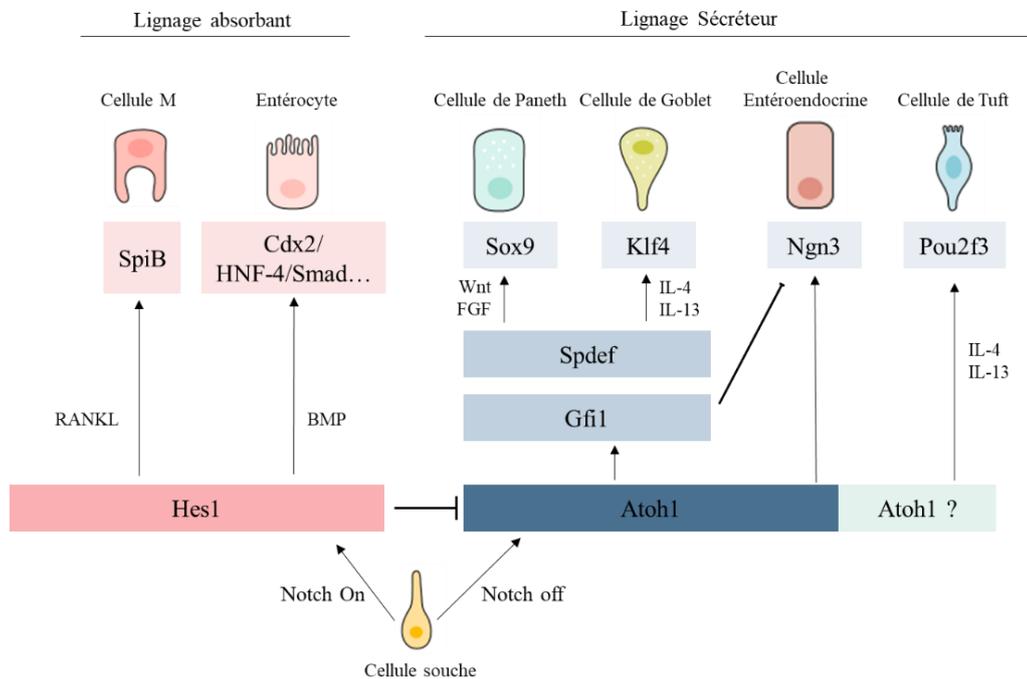


Figure 18 : Différenciation des cellules épithéliales

Les CBC commencent à se différencier dès qu'elles quittent la base de la crypte, le choix initial entre lignage sécréteur et absorbant est déterminé par la signalisation Notch. L'activation de Notch entraîne l'expression de Hes1 et une différenciation vers le lignage absorbant, Hes1 inhibe l'expression d'Atoh1 ce qui renforce l'engagement vers ce lignage. Lorsque Notch n'est pas activé, Atoh1 est donc exprimé et permet l'engagement vers le lignage sécréteur. Dans le lignage sécréteur, Gfi1 est nécessaire pour la différenciation des cellules de Paneth et goblet, et bloque l'expression de Ngn3, et Spdef est requis pour leur maturation terminale. Sox9 et Klf4 sont nécessaires à la différenciation des cellules de Paneth et goblet, respectivement. Ngn3 est requis pour la différenciation des cellules entéroendocrines. Le facteur de transcription Pou2f3 permet la différenciation des cellules de Tuft. Dans le lignage absorbant, la différenciation par défaut mène à la formation d'entérocytes sous le contrôle du gradient croissant de BMP. L'activation de RANK entraîne la différenciation vers les cellules M via l'expression du facteur de transcription SpiB. (D'après Gerbe F. & Jay P., 2016).

Conclusion

La capacité d'autorenouveau constant et de régénération de l'épithélium intestinal souligne l'importance des cellules souches tissulaires. Malgré de nombreuses avancées ces dernières années, notamment par l'utilisation de modèles génétiques et l'identification de marqueurs spécifiques des cellules souches intestinales, de nombreux aspects restent à éclaircir. Parmi ces questions la nature des « vraies » cellules souches ou encore les mécanismes par lesquels les cellules souches +4 maintiennent leur quiescence restent à élucider.

Chapitre 2 : p57^{Kip2}, inhibiteur des complexes cyclines/CDK

I. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère se divise en deux cellules filles génétiquement identiques entre elles. Il se compose de deux phases, l'interphase et la mitose. L'interphase comprend différentes étapes de préparation à la division cellulaire : G₁ (Gap-1), S (Synthesis) et G₂ (Gap-2). Au cours de la mitose (M) la cellule se scinde en deux cellules filles et le matériel génétique et cytoplasmique sont répartis uniformément entre les deux.

1. Les différentes étapes du cycle cellulaire

La majorité des cellules de l'organisme adulte ne se divisent pas, elles sont dites en quiescence ou phase G₀. Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules peuvent entrer dans le cycle et progresser dans la phase G₁. La phase G₁ est généralement la phase la plus longue du cycle cellulaire, elle permet à la cellule de se préparer à la phase S, en synthétisant une grande quantité de protéines. La cellule présente donc une forte activité transcriptionnelle et grossit en taille. En fin de phase G₁, la cellule doit passer le point de restriction, un mécanisme de contrôle qui nécessite la stimulation continue de signaux mitogènes. Si les conditions environnementales ne sont pas favorables au passage de ce point de restriction, la cellule peut repasser en phase G₀, inversement si le point de restriction est franchi le cycle de division est engagé irréversiblement et ne dépend plus de l'apport de signaux extérieurs. La phase S correspond à la phase de réplication de l'ADN au cours de laquelle ont lieu la duplication des chromosomes et du centrosome. La phase G₂ permet à la cellule de se préparer à la mitose, notamment grâce à la présence d'un « checkpoint » qui permet de vérifier la présence de dommage à l'ADN et leur réparation si nécessaire, cette phase est relativement courte. La division cellulaire se produit au cours de la phase M. La mitose est subdivisée en quatre étapes (prophase, métaphase, anaphase et télophase) permettant la séparation symétrique des chromosomes, la mitose se termine par la cytokinèse qui correspond à la séparation physique des deux cellules (Pollard et al., 2007) (**Figure 19**).

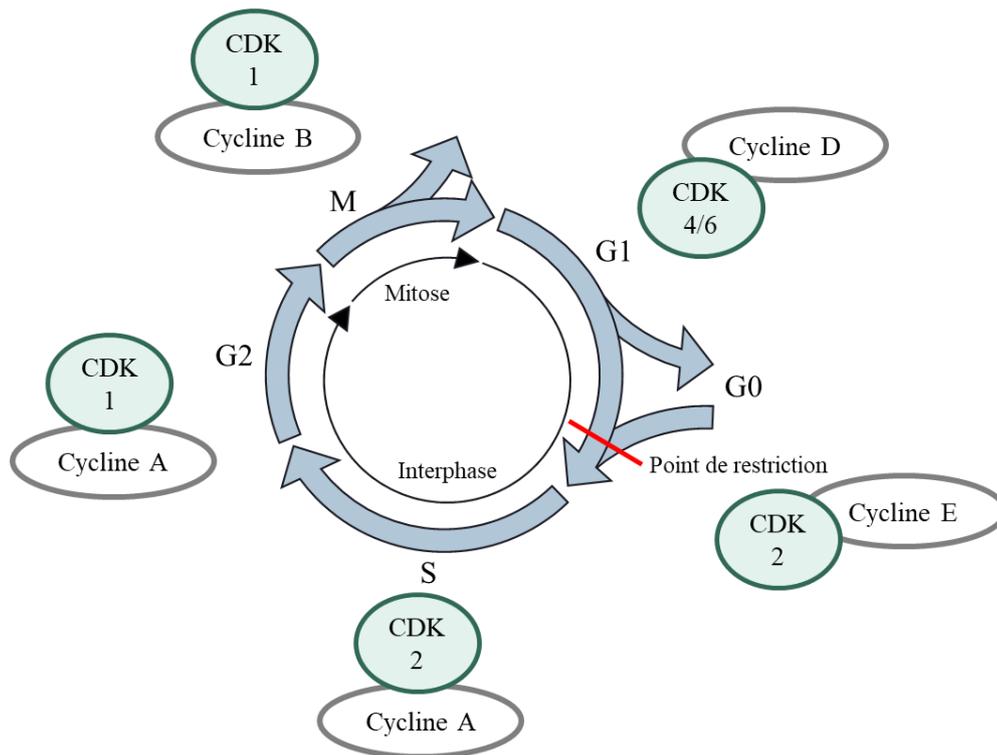


Figure 19 : Le cycle cellulaire

Le cycle de division cellulaire est composé de l'interphase, qui comprend les phases G₁, S et G₂ et de la mitose qui aboutit à la séparation en deux cellules filles. Chaque étape du cycle est régulée par des complexes cycline/CDK spécifiques.

2. Rôles des cyclines et CDK

La progression de la cellule dans le cycle cellulaire est finement régulée par les complexes cycline/CDK. Dans ces complexes, la CDK est la sous-unité catalytique et possède une activité sérine/thréonine kinase et la cycline est la sous-unité qui détermine la spécificité du complexe et active la CDK. Ces complexes ont pour la première fois été identifiés comme régulateur du cycle chez la levure à fission où une CDK unique, *Cdc2*, promeut la transition entre les différentes phases du cycle cellulaire en s'associant avec différentes cyclines. A ce jour, 21 CDK ont été identifiées chez l'homme mais seulement 4 sont directement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (CDK1, CDK2, CDK4 et CDK6) (Lim and Kaldis, 2013 ; Malumbres and Barbacid, 2009). Les cyclines représentent une vaste famille de 29 protéines, classifiées seulement sur la présence d'un domaine « cyclin box » qui permet la liaison aux CDK (Lim and Kaldis, 2013). Chaque CDK peut s'associer avec une ou plusieurs cyclines pour former plusieurs combinaisons, et phosphoryler spécifiquement certains substrats. Les CDK possèdent une boucle T qui bloque l'entrée de la poche catalytique, et l'association des cyclines aux CDK entraîne un changement conformationnel (déplacement de cette boucle T) permettant leur activation partielle. L'activation complète des CDK requière la phosphorylation de

thréonines sur cette boucle T par les CAK (CDK Activating Kinase) (Malumbres and Barbacid, 2005; Pollard et al., 2007) (**Figure 20**).

Chaque étape du cycle est régulée spécifiquement par des complexes cycline/CDK (**Figure 19**) (Malumbres and Barbacid, 2009). L'un des mécanismes les plus étudié est la régulation de l'axe E2F/Rb permettant la transition G₁/S. Les signaux mitogènes induisent la synthèse des cyclines de type D (D1, D2, D3) qui vont s'associer avec les CDK4/6, ce qui aboutit à la phosphorylation des membres de la famille Rb (pRb, p107 et p130). Les protéines Rb inhibent la progression du cycle via l'inhibition du facteur de transcription E2F. La phosphorylation initiale de Rb par les CDK4/6 permet de lever partiellement l'inhibition de E2F, ce qui induit la transcription de la cycline E. La cycline E s'associe ensuite avec CDK2, qui phosphoryle également Rb sur d'autres sites et permet l'activation complète de E2F et le passage du point de restriction (Pollard et al., 2007; Suryadinata et al., 2010).

Les cyclines régulent positivement les CDK, cependant en raison de leur rôle clé dans la prolifération cellulaire, leur activité est également régulée négativement. Les kinases Wee1 et Myt1 peuvent inhiber l'activité kinase par phosphorylation de deux résidus adjacents au niveau de la poche de liaison à l'ATP. Cette inhibition peut être levée par les phosphatases Cdc25 qui agissent donc comme régulateurs positifs des complexes cycline/CDK (Malumbres and Barbacid, 2005 ; Pollard et al., 2007) (**Figure 20**). Enfin les CDK sont régulées négativement par leur interaction avec des protéines inhibitrices, les CKI.

3. Régulation des complexes cyclines/CDK par les CKIs

Les CKI (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*) sont des inhibiteurs des complexes cyclines/CDK et participent ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire. Les CKI sont répartis en deux familles selon leur structure, leur spécificité de liaison aux CDK et leur origine d'évolution ; la famille Ink4 et la famille Cip/Kip (Besson et al., 2008; Sherr and Roberts, 1999).

La famille Ink4 (Inhibitors of CDK4) est composée de quatre protéines p16^{Ink4a} (Serrano et al., 1993), p15^{Ink4b} (Hannon and Beach, 1994), p18^{Ink4c} (Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995) et p19^{Ink4d} (Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995). Ces CKI inhibent spécifiquement CDK4 et CDK6 en empêchant leur interaction avec la cycline D, inhibant ainsi leur activation (**Figure 20**) (Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995; Serrano et al., 1993).

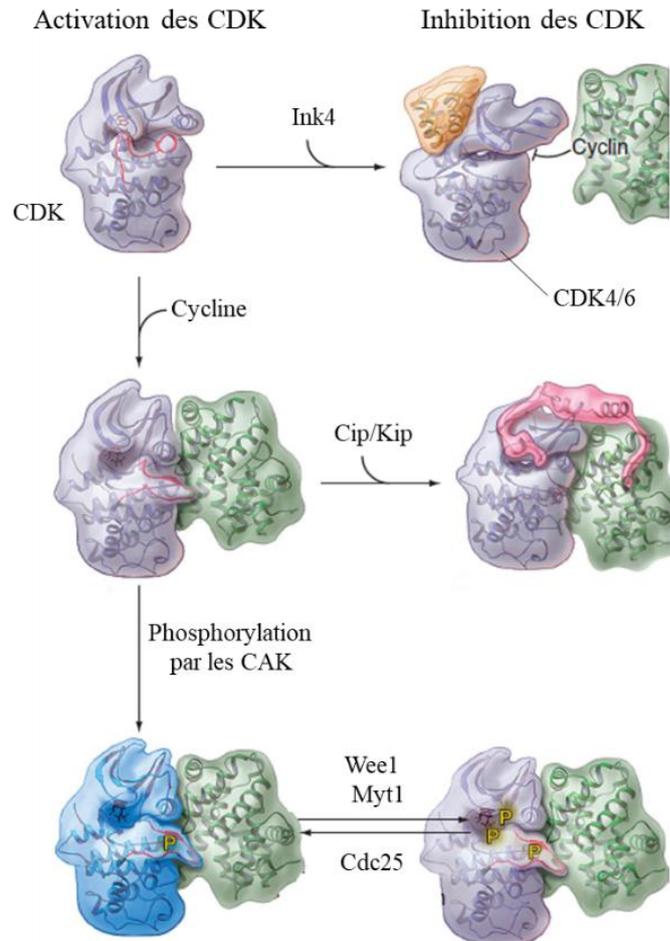


Figure 20 : Régulation de l'activité des CDK

L'activation des CDK nécessite leur interaction avec les cyclines et leur phosphorylation par CAK. Les CDK peuvent être inhibées par les CKI (Ink4 et Cip/Kip) ainsi que par phosphorylation par les kinases Wee1 et Myt1. D'après Pollard T.D et al, 2007

Les membres de la famille Cip/Kip, p21^{Cip1/Waf1} (Harper et al., 1993), p27^{Kip1} (Polyak et al., 1994; Toyoshima and Hunter, 1994) et p57^{Kip2} (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995) sont conservés au niveau du domaine de liaison aux cycline/CDK dans leur partie N-terminale, mais divergent sur leur partie C-terminale, suggérant que chacune de ces protéines possède des fonctions et régulations distinctes (**Figure 21**). Les CKI de la famille Cip/Kip ont la capacité d'inhiber tous les complexes cycline/CDK en se fixant à la fois sur les CDK et sur les cyclines. Cette inhibition se fait par blocage du domaine d'interaction avec les substrats sur les cyclines et par insertion dans la poche catalytique des CDK, bloquant ainsi la liaison de l'ATP (Russo et al., 1996) (**Figure 20**).

Les 3 membres de la famille Cip/Kip présentent des rôles et des régulations différentes au cours du cycle cellulaire. Par exemple p27 et p57 sont induits par des signaux antimitotiques comme le TGF- β ou l'inhibition de contact et entraînent un arrêt du cycle en phase G₁ alors

que p21 est induit par p53 en réponse aux dommages à l'ADN et provoque un arrêt du cycle en G₁ et G₂. Les CKI de la famille Cip/Kip présentent également des profils d'expression tissulaire différents au cours du développement ainsi qu'à l'âge adulte (Nagahama et al., 2001; Nakayama and Nakayama, 1998). Ces différences, à la fois d'expression et de fonction, ont pu être mise en évidence par les différents modèles de souris knockout générés (Table 2) (Ciemerych and Sicinski, 2005).

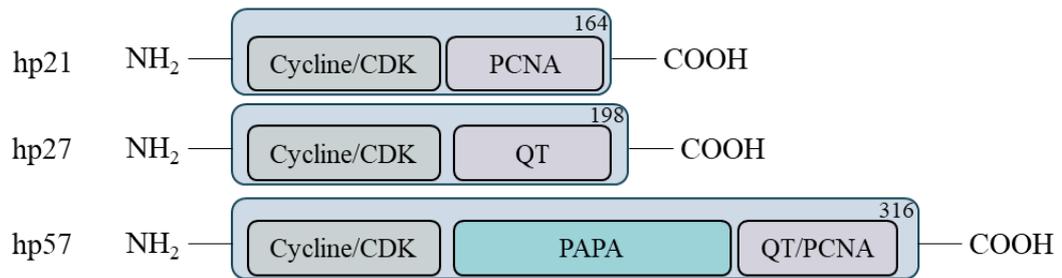


Figure 21 : Structures des protéines p21, p27 et p57

Les membres de la famille Cip/Kip sont très conservés dans leur partie N-terminale, au niveau du domaine de liaison aux cycline/CDK, mais diffèrent sur leur partie C-terminale. Le domaine C-terminal de p57 présente des similarités avec les parties C-terminales de p21 (domaine de liaison à PCNA) et p27 (domaine QT). En plus de ces parties N et C-terminales p57 possède une région centrale spécifique de p57, le domaine PAPA, suggérant donc que p57 possède des fonctions uniques.

Au cours du développement embryonnaire, l'expression de p21 n'est pas induite par p53, mais apparaît au cours de la différenciation terminale de nombreux tissus notamment dans les muscles, le cartilage ou encore la peau (Parker et al., 1995). Les souris p21^{-/-} se développent normalement et ne présentent aucune tumeur jusqu'à environ 7 mois (Deng et al., 1995). Au cours du temps, ces animaux vont cependant développer spontanément des tumeurs d'origine hématopoïétique, endothéliale ou épithéliale (Martin-Caballero et al., 2001). La perte de p21 entraîne également l'accélération du développement de tumeurs mammaires ou salivaires induites pas Ras (Adnane et al., 2000).

p27 est exprimé de façon ubiquitaire chez l'embryon et chez l'adulte (Nakayama and Nakayama, 1998). La perte de p27 n'entraîne pas de défauts majeurs du développement cependant les animaux p27^{-/-} sont significativement plus grands et présentent une hyperplasie de la plupart des organes causée par une hyperprolifération (Nakayama et al., 1996). Les animaux p27^{KO} développent spontanément des tumeurs de la glande pituitaire et sont également plus sensibles aux tumeurs induites par des radiations γ ou bien des carcinogènes chimiques (Fero et al., 1998; Nakayama et al., 1996).

Contrairement aux autres membres de la famille Cip/Kip, p57 joue un rôle critique dans la régulation du cycle cellulaire pendant le développement et il est le seul inhibiteur de CDK requis pour le développement embryonnaire. La perte de p57 chez la souris est létale et les animaux p57^{KO} présentent de multiples anomalies du développement (détaillé p.62) (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Un certain nombre de redondances fonctionnelles et de mécanismes de compensation ont également pu mettre en évidence grâce à la génération de mutants double ou triple knockout (**Table 2**) (Ciemerych and Sicinski, 2005 ; Tateishi et al., 2012) ou encore de mutants knock-in (détaille p.62).

Génotype	Phénotypes	Cancer
p21 ^{-/-}	Viable, pas d'anomalies majeures observées	Développent spontanément des tumeurs avec l'âge, Accélération du développement de tumeurs induites par Ras
p27 ^{-/-}	Viable, Organomégalie, femelles stériles, augmentation de la taille	Tumeurs pituitaires, sensibilise aux tumeurs induites par radiations ou chimiques
p57 ^{-/-}	Létal à la naissance, multiples anomalies du développement	Non étudié <i>in vivo</i> du fait de la létalité des souris
p21 ^{-/-} p27 ^{-/-}	Viable, similaire à p27 ^{KO} avec une hyperplasie des ovaires plus prononcée	Non étudié <i>in vivo</i>
p21 ^{-/-} p57 ^{-/-}	Létal à la naissance, apparition de nouveaux phénotypes (altération pulmonaire et des muscles squelettiques)	Non étudié <i>in vivo</i> du fait de la létalité des souris
p27 ^{-/-} p57 ^{-/-}	Létal a l'état embryonnaire (E12-E16.5), aggravation de certains phénotypes (placenta, cristallin)	Non étudié <i>in vivo</i> du fait de la létalité des souris
p21 ^{-/-} p27 ^{-/-} p57 ^{-/-}	Létal a l'état embryonnaire (E11.5-E15.5), similaire aux p27 ^{-/-} p57 ^{-/-}	Non étudié <i>in vivo</i> du fait de la létalité des souris

Table 2 : Phénotypes associés à la perte des protéines Cip/Kip

En plus de leur fonction d'inhibition du cycle cellulaire, un nombre croissant d'études ont démontré que p21, p27 et p57 sont en réalité des protéines multifacettes capables de jouer de multiples rôles dans la cellule et notamment dans la régulation de l'apoptose, de la migration cellulaire ou encore dans la régulation transcriptionnelle. En effet, ce sont des protéines non structurées capable d'interagir avec de nombreux partenaires pour réguler des processus cellulaires variés (détaillé p.66 pour p57^{Kip2}) (Besson et al., 2008).

II. Structure et régulation de p57

1. La protéine p57

p57^{Kip2} est une protéine de 316 acides aminés chez l'homme et 335 chez la souris, de poids moléculaire d'environ 57 kDa. La protéine murine p57 est organisée en 4 domaines : le domaine I comprend le domaine de liaison au cycline/CDK, le domaine II est une région riche en Proline de 82 acide aminés, suivi du domaine III de 107 résidus riche en acides aminés acides (acides glutamique et aspartique). Enfin le domaine IV comprend un motif conservé appelé domaine QT. La protéine humaine est conservée dans les partie C- et N-terminales, cependant les domaines centraux II et III sont remplacés par un domaine distinct riche en répétitions Proline/Alanine, le domaine PAPA (**Figure 22**) (Lee et al., 1995 ; Matsuoka et al., 1995).

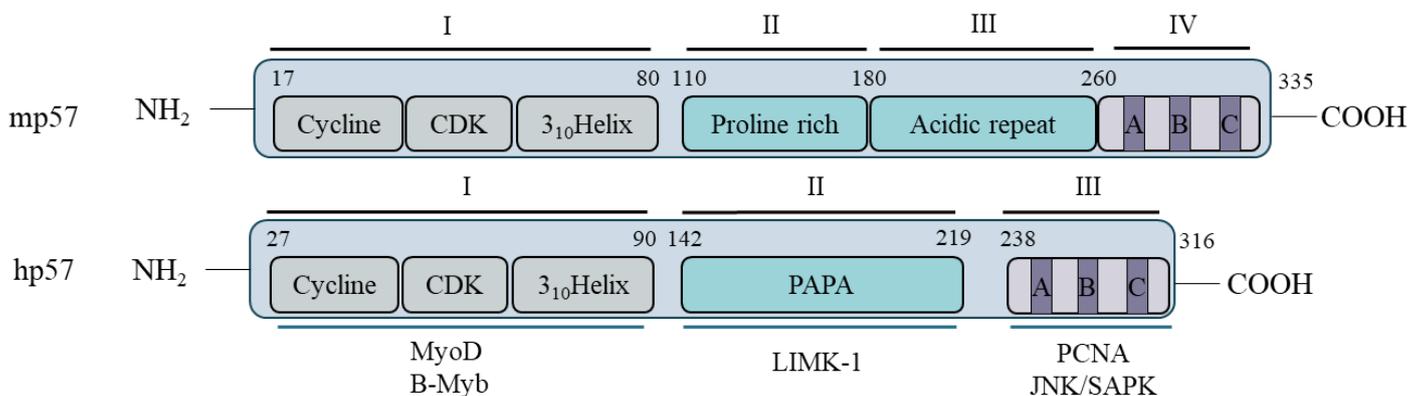


Figure 22 : Structure de p57 et ses principaux interactants

Les protéines murine et humaine sont conservées dans leurs parties N- et C-terminales. La partie N-terminale contient trois domaines : le site de liaison aux cyclines, le site de liaison aux CDK et le motif hélice 3₁₀. Les parties centrales chez la souris ont été substituées par un domaine unique PAPA chez l'homme. La partie C-terminale contient trois motifs : le domaine de liaison à PCNA (A), une séquence NLS (B), et un site consensus de phosphorylation par les CDK (C). p57 est capable de lier de nombreux partenaires via ses différents domaines.

Le domaine N-terminal est nécessaire et suffisant pour l'inhibition des complexes cycline/CDK, ce domaine I est formé de 3 régions : un domaine de liaison aux cyclines, un domaine de liaison au CDK et une hélice 3₁₀. L'hélice 3₁₀ n'est pas requise pour la liaison mais permet l'inhibition de l'activité des complexes Cycline A/CDK2 et Cycline E/CDK2 en s'insérant dans la poche catalytique de CDK2, bloquant ainsi l'hydrolyse de l'ATP (Hashimoto et al., 1998). Ce domaine N-terminal est également le site d'interaction avec des facteurs de transcription tels que b-Myb (Joaquin and Watson, 2003) et MyoD (Reynaud et al., 2000b). Le domaine interne de p57 contient un site consensus de phosphorylation par les MAPK

(Matsuoka et al., 1995). Ce domaine PAPA est spécifique de p57 et pourrait donc être impliqué dans des fonctions autres que l'inhibition des cycline/CDK via l'interaction avec d'autres protéines. En effet, cette région centrale de p57 interagit avec la kinase LIMK1, un effecteur de Rho impliqué dans la régulation de la polymérisation de l'actine (Yokoo et al., 2003). Enfin, le domaine QT présente une homologie avec la partie C-terminale de p27, mais présente également des similarités avec p21 puisqu'il possède un site de liaison à PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Watanabe et al., 1998). p57 est également capable d'interagir avec la kinase JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase/ Stress-Activated Protein Kinase) via ce domaine QT (Chang et al., 2003). Un site consensus NLS (Nuclear Localization Sequence), séquence d'adressage au noyau, a également été identifié dans la partie C-terminale par homologie avec p27 (Lee et al., 1995). Enfin, la partie C-terminale de p57 contient un site consensus de phosphorylation par CDK2 sur la Thr310 chez l'humain (329 chez la souris) qui permet la dégradation de p57 par la voie ubiquitine/protéasome médiée par Skp2-SCF, de façon similaire à la Thr187 sur p27 (Kamura et al., 2003).

De plus, même si le domaine d'interaction n'a pas été déterminé, p57 est capable d'interagir avec plusieurs facteur de transcription bHLH tels que NeuroD ou Ascl1 (Joseph et al., 2009).

Enfin il est important de noter que comme les autres protéines de la famille Cip/Kip, p57 est une protéine intrinsèquement non structurée qui adopte une conformation tertiaire seulement après liaison avec ses différents partenaires (Adkins and Lumb, 2002; Besson et al., 2008). Cette flexibilité conformationnelle lui confère la capacité d'interagir avec de nombreux partenaires pour réguler des processus cellulaires variés.

2. Régulation de l'expression et distribution de p57

p57 présente un profil d'expression tissu-spécifique avec des variations d'expression de l'embryogénèse jusqu'à l'âge adulte.

Au cours de l'embryogénèse p57 est fortement exprimé avec un pic d'expression à des stades clé de différenciation pour chacun des organes. p57 est présent dans les trois feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme), et est retrouvé dans la majorité des organes : cartilages, muscles squelettiques, cœur, système nerveux, et organes parenchymateux (intestin, pancréas poumons, surrénales, thymus, gonade et rein) ainsi que dans les tissus extra-embryonnaires. Après E13.5, son expression diminue fortement dans la plupart des tissus, mais persiste au niveau des muscles squelettiques, du rein, de l'intestin, du palais et du cristallin (Westbury et al., 2001; Yan et al., 1997). Chez l'adulte, p57 est exprimé dans les cellules post-

mitotiques d'un nombre restreint de tissus (cœur, cerveau, poumons, muscles squelettique, placenta, rein, gonades, intestin et plus faiblement dans le foie et dans la rate), ce qui le distingue de p27 et p21 dont l'expression est ubiquitaire (Lee et al., 1995 ; Matsuoka et al., 1995).

L'expression de p57 est finement régulée par de nombreux signaux et facteurs de transcription. Par exemple, les facteurs de transcription E47, E2F1 et EGR1 (Early growth response gene 1), ainsi qu'un traitement aux glucocorticoïdes, stimulent l'expression de p57 (Ma and Cress, 2007; Roeb et al., 2007; Rothschild et al., 2006; Samuelsson et al., 1999). Inversement, les effecteurs de la voie Notch, Hes1 et Herp2, ainsi que les protéines Id2, PAX3-FOXO1 et IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2) répriment son expression (Grandjean et al., 2000 ; Jia et al., 2007; Riccio et al., 2008 ; Roeb et al., 2007 ; Rothschild et al., 2006). Les signaux TGF- β ont des rôles antagonistes suivant les types cellulaires, la voie TGF- β /Smad stimule l'expression de p57 dans les cellules souches hématopoïétiques (Scandura et al., 2004), alors qu'elle induit sa dégradation dans les ostéoblastes (Urano et al., 1999).

La dégradation de p57 se fait essentiellement via la dégradation par le protéasome. La phosphorylation de la thréonine 310 par les complexes cycline/CDK (thréonine 329 chez la souris) permet de créer un site de liaison pour la protéine F-box Skp2 (S phase kinase-associated protein 2), qui forme un complexe ubiquitine ligase Skp2-SCF (Skp1, Cullin, F-box). Cette interaction entraîne l'ubiquitination de p57 et sa dégradation par le protéasome (Kamura et al., 2003). Une deuxième protéine F-box a été décrite comme étant impliquée dans la dégradation de p57. Dans les ostéoblastes, TGF β 1 stimule l'expression de FBL12, une nouvelle protéine F-box, qui va interagir avec p57 et entraîner sa dégradation par le protéasome de façon indépendante de Skp2. La phosphorylation de la thréonine 310 est également nécessaire pour la voie de dégradation FBL12-SCF (Kim et al., 2008). De plus de nombreux mécanismes épigénétiques ont été identifiés dans le contrôle de l'expression de p57.

3. Le gène *CDKN1C* et les pathologies associées

Le gène codant pour p57, *CDKN1C*, localisé dans la région télomérique du chromosome 11 sur le locus 11p15.5 chez l'homme (Matsuoka et al., 1995), contient quatre exons et trois introns et seuls les exons 2 et 3 correspondent aux régions codantes (Tokino et al., 1996).

Le locus 11p15.5 contient plusieurs gènes soumis à l'empreinte parentale jouant un rôle important dans le développement embryonnaire. Le terme d'empreinte parentale ou génomique fait référence aux modifications épigénétiques d'un gène entraînant son expression

monoallélique de façon dépendante de l'origine parentale. Les gènes soumis à empreinte présentent des caractéristiques communes : ils sont regroupés en clusters et la plupart de ces clusters possèdent des centres de régulation ou ICR (Imprinted Control Region) qui sont différenciellement méthylés sur chacun des deux allèles. Ces régions sont également très riches en îlots CpG et comprennent souvent des ARN antisens non codants indispensables au maintien de l'empreinte (Reik and Walter, 2001).

De façon intéressante, la région murine homologue du locus 11p15.5, la partie distale du chromosome 7, présente le même cluster de gènes soulignant l'importance de cette organisation pour la régulation de ces gènes. Ce locus couvre environ 1 Mb et s'organise en deux domaines centromérique et télomérique, contrôlés par deux centres de régulation, l'ICR1 et l'ICR2 (**Figure 23**). L'ICR1 est télomérique et contrôle l'expression réciproque de *H19* (expression maternelle) et *IGF2* (expression paternelle). L'expression de ces deux gènes dépend d'un même couple d'enhancers (Leighton et al., 1995) dont l'accès est régulé par ICR1, qui est méthylé sur l'allèle paternel et non méthylé sur l'allèle maternel. L'ICR1 non méthylé est lié par CTCF (CCCTC-binding factor), un facteur de transcription requis pour le blocage des enhancers, ce qui empêche l'interaction des enhancers avec le promoteur d'*IGF2*, l'interaction se fait alors avec le promoteur de *H19*, qui est exprimé. Inversement, sur l'allèle paternel, l'ICR1 méthylé n'est pas reconnu par CTCF, ce qui permet l'interaction des enhancers avec le promoteur d'*IGF2* et donc son expression (Eggermann et al., 2014b; Hark et al., 2000).

Le domaine centromérique s'étend sur environ 800 kb et contient de nombreux gènes soumis à l'empreinte notamment *CDKN1C*, *KCNQ1* et *KCNQ1OT1*, aussi connu sous le nom de *LIT1* (*Long QT intron transcript 1*). Certains gènes de ce domaine sont soumis à l'empreinte de façon ubiquitaire et d'autres uniquement dans le placenta (*Ascl2*, *CD81*, *Tssc4*). La plupart des gènes de cette région s'expriment à partir de l'allèle maternel. La régulation de ces gènes dépend de l'ICR2 qui est localisé dans l'intron 10 de *KCNQ1*, ce qui correspond au promoteur de *LIT1*. ICR2 est méthylé sur l'allèle maternel et non méthylé sur l'allèle paternel ce qui permet l'expression de *LIT1* à partir de l'allèle paternel. *LIT1* est un ARN non codant antisens qui permet la répression paternelle des autres gènes du domaine (Eggermann et al., 2014b; Fitzpatrick et al., 2002) (**Figure 23**). Lorsqu'il est exprimé, *LIT1* interagit directement avec la chromatine au niveau des promoteurs des gènes soumis à l'empreinte et recrute des complexes histone méthyltransférase (Ezh2, G9a), entraînant ainsi un état répressif de la chromatine (Pandey et al., 2008). De plus, *LIT1* réprime l'expression des gènes soumis à l'empreinte de façon ubiquitaires via le recrutement de Dnmt1 (DNA méthyltransférase 1) au niveau de leur

promoteurs, causant leur hyperméthylation et renforçant ainsi leur répression paternelle (Mohammad et al., 2010).

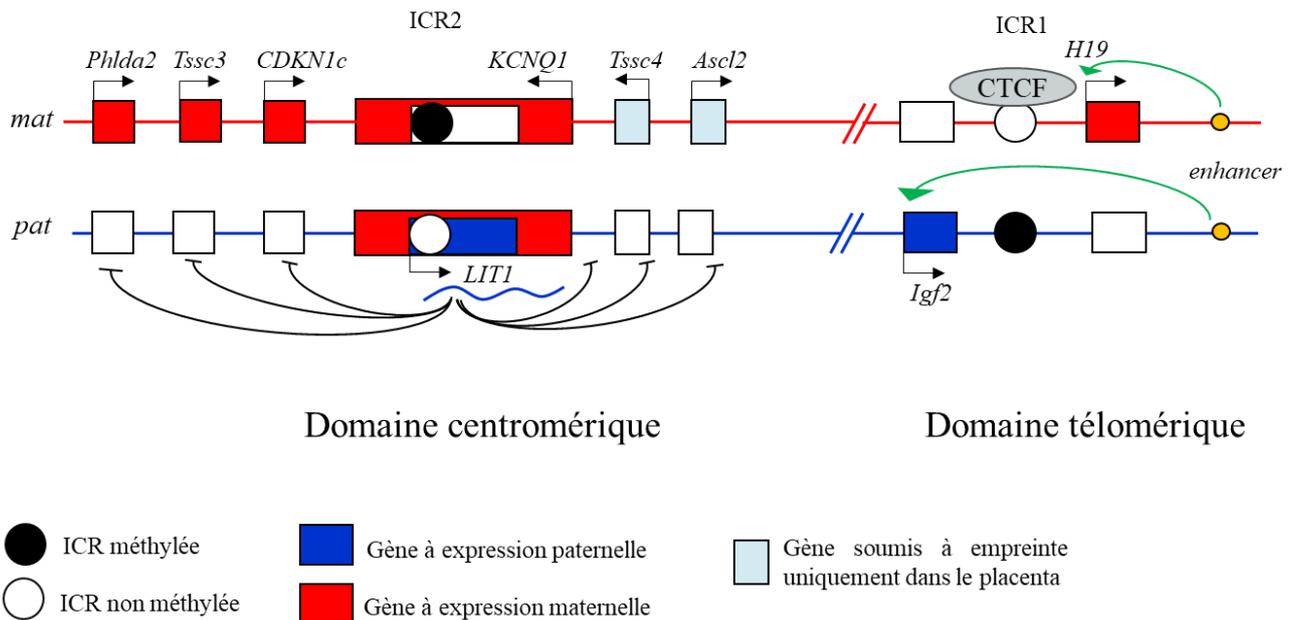


Figure 23 : Contrôle de l'empreinte parentale du locus 11p15.5

Le locus 11p15.5 s'organise en 2 domaines : télomérique contrôlé par l'ICR1 et centromérique régulé par l'ICR2. Le domaine télomérique comprend 2 gènes *H19* et *IGF2* exprimés réciproquement. L'empreinte est maintenue grâce à un mécanisme de compétition par rapport à un enhancer commun. Le domaine centromérique ICR2 contient de nombreux gènes soumis à l'empreinte et la répression paternelle des gènes de ce domaine est maintenue grâce à l'ARN non codant LIT1. (D'après Gabory A & Dandolo L., 2005)

L'analyse du promoteur de *CDKN1C* a révélé la présence de nombreux sites consensus pour divers facteurs de transcription dont plusieurs sites SP1 (Stimulatory protein-1), un site GRE (Glucocorticoid response element), une TATA box, et des sites de liaison pour les effecteurs de Notch Hes1 et Herp2 (hes-related repressor protein 2) (Pateras et al., 2009). L'accès à ces sites est fortement régulé par la présence d'îlots CpG localisés en amont et en aval du site de départ de la transcription, ces îlots CpG jouent un rôle important dans le maintien de l'empreinte mais également dans l'expression tissu-spécifique de p57 qui pourrait être liée à des différences de méthylation du promoteur (Pateras et al., 2009). Ces sites semblent particulièrement importants dans les tumeurs où une répression de p57 causée par des modifications épigénétiques est fréquemment observée (Kikuchi et al., 2002; Luo et al., 2013; Satoh et al., 2006; Weis et al., 2015; Yang et al., 2009).

Des dérégulations de l'empreinte de ce locus 11p15.5 ainsi que des mutations de *CDKN1C* entraînant une perte d'hétérozygotie (LOH = Loss Of Heterozygosity) sont responsables de

pathologies héréditaires et sont également impliquées dans l'apparition d'un certain nombre de cancers.

3.1. Perte de fonction : le syndrome Beckwith-Wiedemann

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (OMIM n°130650) est un syndrome génétique rare avec une prévalence d'un cas sur 13 700 naissances, caractérisé par une croissance excessive, des anomalies du développement et une prédisposition tumorale pendant l'enfance. BWS a une pénétrance très variable et les patients ne présentent généralement qu'un sous-ensemble de phénotypes. Le diagnostic repose alors sur la présence d'au moins trois critères majeurs ou l'association de deux critères majeurs avec au moins un critère mineur (Weksberg et al., 2010) (Table 3). Une anomalie moléculaire de la région 11p15.5 est identifiée dans environ 80% des patients BWS, ces anomalies peuvent être épigénétiques ou génétiques. La plupart des anomalies épigénétiques sont mosaïques, c'est-à-dire que seulement une partie des cellules est porteuse de l'anomalie moléculaire. La sévérité du phénotype dépend du mécanisme moléculaire sous-jacent et du pourcentage de mosaïcisme (Brioude et al., 2013a).

<i>Signes majeurs</i>	<i>Signes mineurs</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Macrosomie • Macroglossie • Hémihyperplasie • Anomalies de la paroi abdominale (omphalocèle ou hernie ombilicale) • Viscéromégalie (foie, rate, rein, glande surrénale, pancréas) • Tumeur embryonnaire (tumeur de Wilms, hépatoblastome, neuroblastome, rhabdomyosarcome) • Anomalies rénales • Fentes palatines • Cytomégalie surrénalienne • Anomalies des oreilles 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypoglycémie néonatale, hyperinsulinémie • Anomalies cardiaques (cardiomégalies, malformations) • Complication des grossesses (prééclampsie, accouchement prématurés) • Lésions vasculaires • Vieillesse osseuse

Table 3 : Critères de diagnostic du syndrome de Beckwith-Wiedemann

D'autres signes cliniques ont également été rapportés avec une fréquence moindre : malrotation intestinale, retard mental et polydactylie (doigt surnuméraire) (Elliott et al., 1994).

La majorité des patients atteints de BWS présentent des anomalies épigénétiques (70% des cas). Des pertes de méthylations de l'ICR2 sur l'allèle maternel représentent la forme la plus fréquente et sont observées chez 50% des patients. Cette anomalie entraîne une expression biallélique de *LIT1* et donc une perte d'expression de *CDKN1C* (Eggermann et al., 2014b). Les

patients atteints d'anomalies de cette région centromérique présentent un phénotype plus sévère avec des macroglossies et des défauts de la paroi abdominale. Des gains de méthylation de l'ICR1 sont également observés dans 5% des cas, ce qui aboutit à une expression biallélique d'*IGF2*. Les patients présentant cette anomalie ont un risque plus élevé de développer des tumeurs et d'organomégalie (Brioude et al., 2013a ; Weksberg et al., 2010).

En plus de ces anomalies épigénétiques, des altérations génétiques sont également responsables de BWS. Parmi ces anomalies génétiques, des isodisomies paternelles (UPD = Uniparental Disomy) sont retrouvée chez environ 20% des patients. Les UPD correspondent à l'expression de deux copies paternelles de la région 11p15.5 et aucune contribution maternelle pour cette région, ce qui conduit donc à une expression biallélique de *IGF2* et à une perte d'expression de *CDKN1C* (Weksberg et al., 2010). Les patients atteints d'UPD présentent un risque accru d'hémihyperplasie (Brioude et al., 2013a). D'autres réarrangements chromosomiques ont également été rapportés dans de rares cas (2-3 %), ils comprennent des duplications paternelles importantes, incluant les régions ICR1 et ICR2 (1 %), des translocation/inversion (1 %) qui sont généralement transmise par la mère, ainsi que des microdélétions des ICR (<1 %) (Eggermann et al., 2014a; Weksberg et al., 2010).

Enfin des mutations ponctuelles de *CDKN1C* sont observées dans 8 % des cas sporadiques et sont responsables de la majorité des cas familiaux (50 %) de BWS (Eggermann et al., 2014b). Les patients porteurs de mutations de *CDKN1C* présentent certains phénotypes particuliers, ils sont quasiment tous atteints de défauts de fermeture la paroi abdominale (hernie ombilicale ou omphalocèle) et ont une incidence accrue de fentes palatines, d'anomalies génitales et de polydactylie (Romanelli et al., 2010). Les mutations de *CDKN1C* décrites dans BWS couvrent l'ensemble de la séquence codante (**Figure 24**), il s'agit le plus souvent de mutations non-sens entraînant une troncation de la protéine ou de mutations causant un décalage du cadre de lecture ce qui altère fortement la structure de la protéine. Certaines mutations faux-sens ont également été décrites au niveau du domaine de liaison aux cycline/CDK (Brioude et al., 2015 ; Eggermann et al., 2014b).

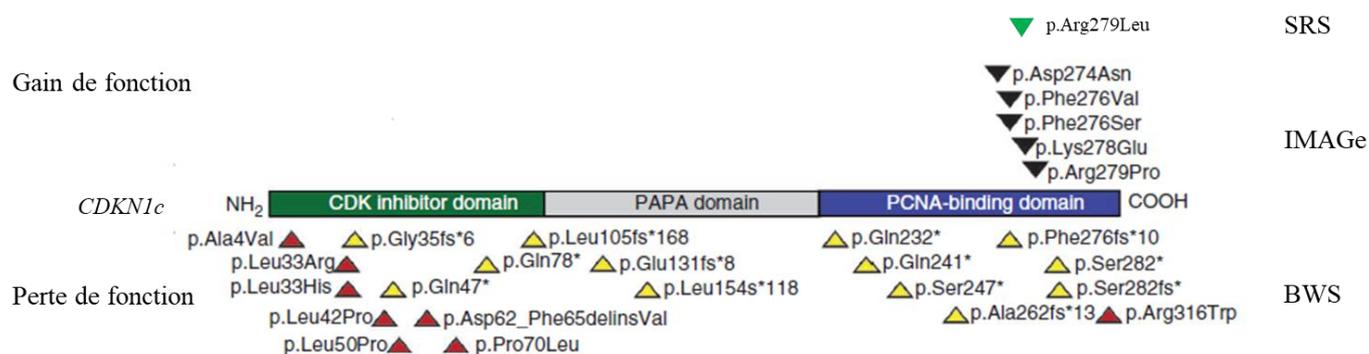


Figure 24 : Mutations de CDKN1C dans les syndromes génétiques

Des mutations faux-sens (flèches rouges) ou tronquante (flèche jaunes) entraînant une perte de fonction de p57 causent BWS, ces mutations couvrent l'ensemble de la séquence codante. Des mutations gains de fonctions localisées dans le domaine de liaison à PCNA sont l'origine du syndrome IMAGe (flèche noires) et SRS (flèche verte). Arboleda et al., 2012

3.2. Gain de fonction : syndromes IMAGe et Silver-Russell

A l'inverse de BWS, des mutations gain de fonction de p57 sont associées avec les syndromes Silver-Russell (SRS) (OMIM n°180860) (Brioude et al., 2013b) et IMAGe (Intrauterin Growth Retardation, Metaphyseal dysplasie, Adrenal insufficiency, Genital abnormalities) (OMIM n° 300290) (Arboleda et al., 2012). Ces pathologies causent un phénotype miroir à BWS et présentent un certains nombres de caractéristiques communes, en particulier un retard de croissance intra-utérin (Table 4) (Eggermann et al., 2014b).

Les anomalies moléculaires les plus fréquemment observées chez les patients SRS consistent en une perte de méthylation de l'ICR1 (60 % des cas), entraînant une expression biallélique de *H19* et donc une perte d'expression d'*IGF2*. Des réarrangements chromosomiques avec des duplications maternelles du domaine centromérique ou des deux domaines ont aussi été observées (Wakeling et al., 2017). Des mutations gain de fonction de *CDKN1C* ont également été décrites comme étant à l'origine de ces pathologies. L'étude d'une forme familiale du syndrome IMAGe a permis l'identification de 5 mutations faux-sens situées dans le domaine de liaison à PCNA (Figure 24) (Arboleda et al., 2012). L'expression d'un transgène exprimant ces mutations chez la drosophile a permis de confirmer l'effet gain de fonction de ces mutations puisqu'un effet anti-prolifératif a été observé (diminution de la taille de l'aile, des yeux et du réseau vasculaire). *In vitro*, il a été montré que ces mutations perturbent la liaison à PCNA et entraînent un défaut d'ubiquitination (Arboleda et al., 2012). De manière similaire, une mutation gain de fonction dans le domaine de liaison à PCNA a été identifié dans une forme familiale de SRS (Figure 24) (Brioude et al., 2013b). Cette mutation affecte le résidu Arg279 (pArg279Leu), également muté dans le syndrome IMAGe (pArg279Pro). De façon intéressante, des expériences *in vitro* ont révélées que la surexpression d'un transgène portant

cette mutation n'affecte pas le cycle cellulaire mais entraîne une stabilisation de la protéine, ce qui est cohérent avec le défaut d'ubiquitination précédemment observé dans le syndrome IMAGe (Brioude et al., 2013b).

Silver-Russell	IMAGe
Fréquence : 1 cas sur 100 000 naissances	Fréquence : 25 cas rapportés
<ul style="list-style-type: none"> • Retard de croissance intra-utérin • Retard de croissance post natal • Macrocéphalie • Faciès caractéristique (front bombé) • Asymétrie corporelle • Taches cutanées • Sueurs nocturnes • Anomalies génitales chez les garçons • Malformation articulaire • Retard cognitif, moteur et/ou de langage • Difficulté d'alimentation 	<ul style="list-style-type: none"> • Retard de croissance intra-utérin • Hypoplasie et insuffisance surrénalienne • Faciès caractéristique (bosses frontales, anomalies du nez) • Membres courts • Anomalies génitales chez les garçons

Table 4 : Caractéristiques des syndromes Silver-Russell et IMAGe

3.3.p57 et cancer

De par sa fonction de régulateur négatif du cycle cellulaire, p57 est un potentiel suppresseur de tumeur. Cependant la létalité des souris p57^{KO} a pour l'instant empêché de tester cette hypothèse correctement et aucune publication faisant usage des deux modèles de souris knockout conditionnelle de p57 (Mademtzoglu et al., 2017; Matsumoto et al., 2011) n'a été publiée jusqu'à présent. La question de l'implication de p57 dans les cancers reste donc ouverte. Néanmoins, une diminution de l'expression de p57 est observée dans de nombreux types de tumeurs, notamment dans les cancers gastriques, colorectaux, pancréatiques, pulmonaires, mammaires, ainsi que dans les leucémies (Pateras et al., 2009; Stampone et al., 2018). De plus, la diminution de son niveau d'expression est corrélée avec l'agressivité dans plusieurs tumeurs et est associée à un mauvais pronostic clinique (Kavanagh and Joseph, 2011 ; Qiu et al., 2018). Aucune mutation du gène n'a été observée dans les cancers jusqu'à présent (Pateras et al., 2009). La perte d'expression de p57 dans les carcinomes humains est principalement causée par des pertes d'hétérozygotie du locus 11p15.5, des augmentations de méthylation au niveau du promoteur de *CDKN1C* ainsi que des méthylations des histones (Kikuchi et al., 2002; Pateras et al., 2006). Plusieurs miRNA ont également été montrés comme étant des répresseurs de p57 dans plusieurs types de cancers, notamment les miR-221/222 qui sont surexprimés dans les cancers hépatiques, colorectaux, oraux et les glioblastomes (Kavanagh and Joseph, 2011 ; Stampone et al., 2018). Enfin, la répression de

p57 peut également être associée à une augmentation de sa dégradation causée par la surexpression de Skp2 (Pateras et al., 2006).

3.4. Les modèles animaux

La perte de *Cdkn1c* chez la souris ($p57^{KO}$) entraîne un phénotype similaire à BWS, bien que beaucoup plus sévère, avec également des variabilités de pénétrance de certains phénotypes (Yan et al., 1997 ; Zhang et al., 1997). Les animaux $p57^{KO}$ présentent une mortalité embryonnaire et périnatale élevée, et moins de 10% des animaux survivent à l'âge adulte. Les embryons $p57^{KO}$ présentent également de nombreuses anomalies du développement, certaines présentes dans BWS, qui sont principalement causées par des défauts de différenciation et une augmentation de l'apoptose. Par exemples les souris $p57^{KO}$ présentent des fentes palatines, des défauts de fermeture de la paroi abdominale (hernie ombilicale et omphalocèle) associés à un défaut de développement des muscles de la paroi abdominale, des anomalies digestives (malrotation et raccourcissement de l'intestin, désorganisation tissulaire), un raccourcissement osseux en rapport avec un défaut de différenciation des chondrocytes, une hyperplasie surrénale, une dysplasie rénale, et une augmentation de l'apoptose dans le cristallin (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997) (Table 5, Figures 25 & 26). De manière cohérente avec le mécanisme d'empreinte, les animaux ayant hérité l'allèle muté de la mère, $p57^{+/-m}$, présentent le même phénotype que les animaux $p57^{-/-}$ (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Ces études ont donc montré que p57 est requis pour le développement embryonnaire, à l'inverse des autres inhibiteurs de CDK de la famille Cip/Kip dont les knockouts sont viables et ne présentent pas d'anomalies embryonnaires (discuté p.52) (Besson et al., 2008).

De façon intéressante les doubles knockouts $p27^{-/-}p57^{-/-}$ et $p21^{-/-}p57^{-/-}$ présentent une aggravation de certains phénotypes (défauts du placenta et du cristallin, augmentation de la létalité embryonnaire chez les animaux $p27^{-/-}p57^{-/-}$, et aggravation des défauts du squelette chez les mutants $p21^{-/-}p57^{-/-}$) ainsi que l'apparition de nouveaux phénotypes (altération du développement pulmonaire et défaut des muscles squelettiques chez les animaux $p21^{-/-}p57^{-/-}$) (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1999). De plus, un modèle de souris knock-in $p57^{p27KI}$, où p27 a été inséré dans le locus de p57, a montré que la présence de p27 permet de corriger un certain nombre de phénotypes causés par l'absence de p57 (Table 5), ce qui révèle donc des fonctions redondantes entre p27 et p57 et souligne l'importance de l'inhibition des CDK par p57 au cours du développement. Cependant, certains phénotypes causés par la perte de p57 ne sont pas restaurés chez ces mutants $p57^{p27KI}$ (Susaki et al., 2009). De plus, la génération d'un

mutant knock-in $p57^{CK-}$, dans lequel p57 ne lie plus les complexes cycline/CDK (le mutant CK^- porte 2 mutations sur le domaine de liaison aux cyclines, R33A et F36D, et 2 mutations sur le domaine de liaison aux CDK W63A et F67D) a fourni la preuve génétique de rôles indépendants des cycline/CDK au cours du développement. En effet, certains phénotypes présents chez les souris $p57^{KO}$ sont absents chez les souris $p57^{CK-}$, ce qui montre donc que BWS résulte en partie de la perte de fonctions indépendantes des CDK de p57 (Table 5, Figure 26). Certains phénotypes sont également aggravés par cette mutation CK^- , ce qui suggère que dans ces tissus p57 joue des rôles à la fois dépendants et indépendants des CDK (Table 5, Figure 26). De plus, la mutation CK^- entraîne un défaut de dégradation de p57 causant une augmentation de son expression, cette aggravation des phénotypes pourrait donc aussi être causée par un excès d'expression de $p57^{CK-}$ (Duquesnes et al., 2016).

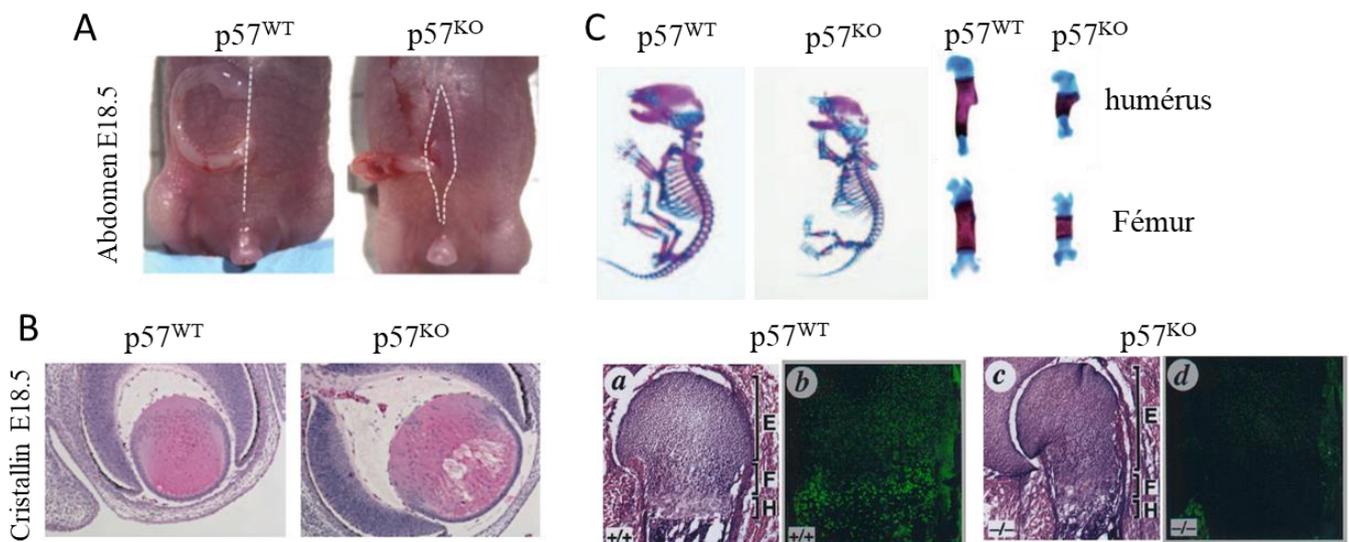


Figure 25 : Les souris $p57^{KO}$ présentent de nombreuses anomalies du développement

Les souris $p57^{KO}$ présentent de nombreuses anomalies du développement CDK dépendantes : un retard de migration des muscles de la paroi abdominale (A), un défaut de développement du cristallin causé par une augmentation de l'apoptose (B) (Photos de Duquesnes N. et al, 2016), ainsi qu'un raccourcissement osseux avec un retard d'ossification associé à un défaut de différenciation des chondrocytes (C) visible après marquage du squelette par le bleu alcian (cartilage) et le rouge alizarine (os) (en haut, Susaki et al, 2009). Le défaut de différenciation de chondrocytes est illustré par l'élongation de l'épiphyse, p57 est fortement exprimé dans les chondrocytes en cours de différenciation (C, et b) (Yan et al. 1997).

p57 ^{KO}	p57 ^{p27KI}	p57 ^{CK-}	Fonction par rapport aux CDK
<ul style="list-style-type: none"> • Létalité néonatale • Défaut du cristallin • Raccourcissement osseux 	Corrigé Corrigé Corrigé	Présent Présent Présent	Dépendant Dépendant Dépendant
<ul style="list-style-type: none"> • Défaut de fermeture de la paroi abdominale* 	Présent	Présent	Indépendant et commun à p27 et p57
<ul style="list-style-type: none"> • Raccourcissement de l'intestin 	Corrigé	Corrigé	Indépendant et commun à p27 et p57
<ul style="list-style-type: none"> • Dysplasie rénale* 	Présent	Corrigé	Indépendant
<ul style="list-style-type: none"> • Fentes palatines* 	Corrigé	Augmenté	Dépendant et Indépendant
<ul style="list-style-type: none"> • Hyperplasie des glandes surrénales* 	50% Corrigé	Augmenté	Dépendant et Indépendant

Table 5 : Résumé des phénotypes observés chez les animaux p57^{KO}, p57^{p27KI} et p57^{CK-}

* : phénotypes présents chez BWS (Duquesnes N. et al, 2016)

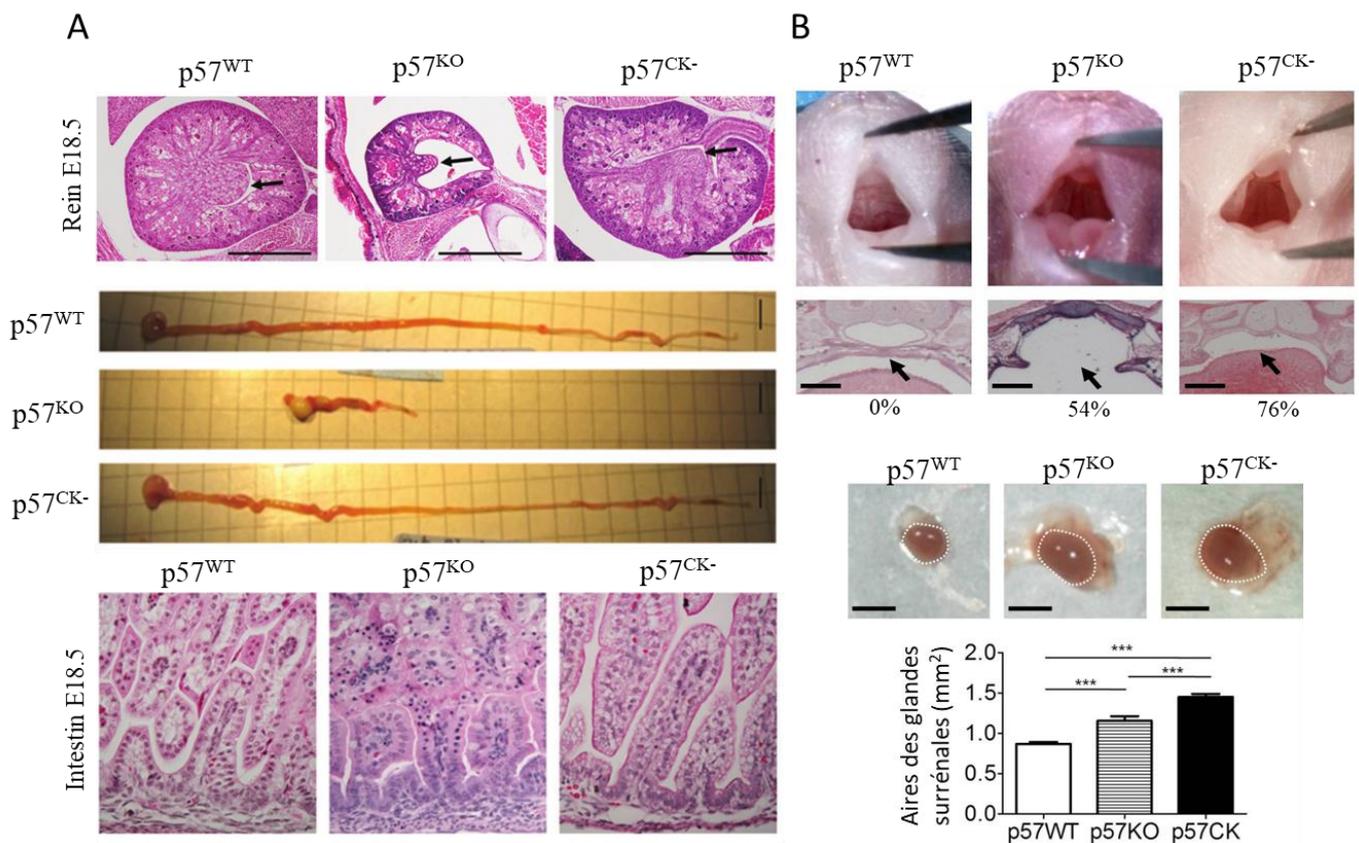


Figure 26 : Phénotypes indépendants de l'inhibition des CDK

La dysplasie rénale et les défauts de développement intestinaux (raccourcissement et désorganisation tissulaire) sont absents chez les souris p57^{CK-}, ce qui indique que p57 a des fonctions indépendantes des CDK dans le développement de ces tissus (A). Certains phénotypes sont aggravés dans les animaux mutants, les souris p57^{CK-} présentent une augmentation de l'incidence des fentes palatines ainsi qu'une hyperplasie plus importante des glandes surrénales (B) ce qui suggère que dans ces organes p57 exerce à la fois des fonctions dépendantes et indépendantes des CDK. (Duquesnes N. et al, 2016).

III. Fonctions de p57

p57 a initialement été décrit comme inhibiteur du cycle cellulaire via l'inhibition des complexes cycline/CDK. Cependant, de nouvelles fonctions de p57 ont récemment été découvertes. Cette capacité de p57 à réguler des processus cellulaires variés est probablement liée à sa capacité à interagir avec de nombreux partenaires protéiques. En effet, un interactome a permis d'identifier 183 partenaires potentiels impliqués dans diverses fonctions cellulaires, notamment la régulation de la transcription, du cytosquelette et de l'apoptose (Duquesnes et al., 2016).

1. p57 : régulateur du cycle cellulaire

Comme les autres membres de la famille Cip/Kip, l'expression de p57 entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G₁. p57 est capable de lier et d'inhiber l'ensemble des complexes cycline/CDK avec cependant une affinité moins importante pour les complexes cycline B/CDK1 et cycline D2/CDK6 (Matsuoka et al., 1995). Il a également été montré que p57 est capable de favoriser l'interaction entre Cycline D1/CDK4, entraînant ainsi la formation d'un complexe actif (Reynaud et al., 2000a). p57 peut également inhiber le cycle cellulaire via l'inhibition de PCNA. En effet, il a été montré *in vitro* que la perte de liaison des CDK ou de PCNA entraîne une inhibition partielle de l'activité de p57 alors que l'invalidation de ces deux interactions abolit complètement l'activité inhibitrice du cycle cellulaire de p57 (Watanabe et al., 1998).

p57 joue également un rôle dans la régulation de l'endoréplication. L'endoréplication est une succession de phases G₁ et S en l'absence de mitose, entraînant la formation de cellules géantes polyploïdes. Ce phénomène est observé par exemple dans les trophoblastes au cours de leur différenciation, ce qui permet l'implantation du placenta. Les niveaux protéiques de p57 oscillent au cours de ce phénomène, diminuant avant l'entrée en phase S et s'accumulant après la fin de cette phase S et en G₁ (Hattori et al., 2000). La présence de p57 est requise pour l'endoréplication et la différenciation des trophoblastes (Ullah et al., 2008).

Enfin, la surexpression de p57 induit un phénotype de sénescence dans plusieurs types cellulaires (lignées d'hépatocytes, d'astrocytomes, et cellules épithéliales de la prostate et urothéliale) (Giovannini et al., 2012 ; Schwarze et al., 2001; Tsugu et al., 2000). Ce phénotype de sénescence est caractérisé par une augmentation de p16 ainsi qu'une induction partielle de

l'expression de la β -galactosidase (Tsugu et al., 2000). Cependant, les mécanismes par lesquels p57 est capable d'induire cet état de sénescence n'ont pas encore été identifiés.

2. Fonctions non canoniques de p57

Un nombre croissant d'études rapporte qu'en plus de sa fonction d'inhibiteur du cycle cellulaire, p57 possède de nombreuses fonctions non-canoniques impliquées dans des processus biologiques variés.

2.1.Régulation du cytosquelette

Tous les membres de la famille Cip/Kip ont été montrés comme ayant un rôle dans la régulation de la migration cellulaire et de l'organisation du cytosquelette en agissant à différents niveaux de la voie Rho/ROCK/LIMK/Cofiline (Besson et al., 2008). Il a été montré que l'extinction de p57 par shRNA *in vivo* entraîne un retard de migration neuronale dans le cortex au cours du développement (Itoh et al., 2007).

p57 est capable d'interagir avec LIMK1 via son domaine central (Yokoo et al., 2003). LIMK1 est une sérine/thréonine kinase permettant l'assemblage des fibres de stress d'actine via la phosphorylation inhibitrice de Cofiline, une protéine qui cause le désassemblage des fibres d'actine, LIMK1 est activée par les effecteurs de RhoA, ROCK1/2 (Rho-kinases) (Bernard, 2007). Une étude réalisée dans les ostéoblastes a montré que la liaison de p57 à LIMK1 entraîne sa translocation et séquestration nucléaire diminuant son activité inhibitrice sur Cofiline et la formation de fibres de stress (Yokoo et al., 2003). En accord avec ses résultats, il a été montré que la transfection de p57 dans des cellules de Schwann, entraîne une relocalisation nucléaire de LIMK1 et un défaut de différenciation (Heinen et al., 2008b).

En opposition à ces conclusions, l'interaction entre p57 et LIMK1 a été confirmée dans les cellules HeLa. Cependant dans ce contexte, l'interaction entre p57 et LIMK1 ne mène pas à une relocalisation de LIMK1 mais, entraîne à une augmentation de son activité kinase de façon indépendante de ROCK, ce qui aboutit donc à une augmentation du nombre de fibres de stress et une diminution de la migration cellulaire (Vlachos and Joseph, 2009). Des données non publiées de notre équipe obtenues dans des fibroblastes issus de souris p57^{+/+} et p57^{-/-} sont en accord avec ces résultats, les cellules p57^{-/-} migrent plus rapidement que les cellules p57^{+/+}.

Le rôle de p57 sur le remodelage du cytosquelette est donc médié via son interaction avec LIMK1 et semble être fonction du contexte et de sa localisation subcellulaire.

2.2. Rôle dans l'apoptose

Plusieurs des phénotypes observés chez les souris p57^{KO} peuvent être attribués à une augmentation de l'apoptose permettant de compenser l'hyperprolifération et les défauts de différenciation. p57 a la capacité de moduler l'apoptose par différents mécanismes et des rôles pro et anti-apoptotiques ont été rapportés en fonction du contexte cellulaire, de la voie de signalisation impliquée et du stress auquel sont soumises les cellules (**Figure 27**).

Un moyen par lequel p57 est capable de protéger contre l'apoptose est via l'inhibition des CDK. Il a été montré que la protéine kinase SAPK p38, une protéine activée en réponse à différents stress, est capable de phosphoryler p57 sur la Thréonine 143 ce qui augmente son affinité pour CDK2 et résulte en un arrêt du cycle cellulaire en G₁. Les cellules déficientes pour p38 ou p57 présentent une diminution de viabilité en réponse à différents stress comme le stress osmotique, l'exposition aux UVs ou le stress oxydatif (Joaquin et al., 2012). Dans ce contexte l'augmentation d'activité de p57 protège donc les cellules contre l'apoptose.

Des mécanismes indépendants de l'inhibition des CDK ont également été décrits, notamment via la participation à la voie de signalisation JNK/SAPK. p57 peut interagir par son domaine QT avec la kinase JNK1, ce qui empêche son interaction avec c-Jun et inhibe son activité kinase. L'expression du domaine QT est suffisante pour bloquer l'apoptose médiée par JNK/SAPK en réponse aux UVs ou à la surexpression de MEKK (Chang et al., 2003).

Inversement, il a été montré que p57 potentialise le rôle pro-apoptotique de la staurosporine dans les cellules HeLa (Samuelsson et al., 2002). p57 ne montre pas d'effet pro-apoptotique propre, mais sensibilise les cellules à l'apoptose en réponse des agents génotoxiques comme la staurosporine, le cisplatine ou l'étoposide, cependant p57 n'a aucun effet sur l'apoptose médiée par la voie extrinsèque Fas (Vlachos et al., 2007). L'effet pro-apoptotique de p57 en réponse à ces drogues est indépendant des CDK et implique l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. En réponse à la staurosporine, p57 se relocalise au niveau de la mitochondrie et promeut l'activation de Bax et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, entraînant ainsi un relargage du cytochrome-c et des signaux apoptotiques dans le cytoplasme, menant à l'activation consécutive des caspases-9 et -3 (Vlachos et al., 2007). La spécificité de la voie mitochondriale a été confirmée par la surexpression de Bcl-2 qui permet d'abolir les effets de p57 (Vlachos et al., 2007). Le mécanisme par lequel p57 active la voie mitochondriale est dépendant de sa capacité à interagir avec LIMK1 et à stimuler son activité. La stabilisation de l'actine entraîne le déplacement de l'héxokinase 1 (HK-1), une enzyme régulatrice du canal

VDAC (Voltage Dependant Anion Channel) de la mitochondrie, ce qui permettrait la dépolarisation membranaire mitochondriale et l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (Kavanagh et al., 2012). Enfin il a également été montré que l'inhibition de p57 supprime l'apoptose médiée par p73 β en réponse au cisplatine (Gonzalez et al., 2005).

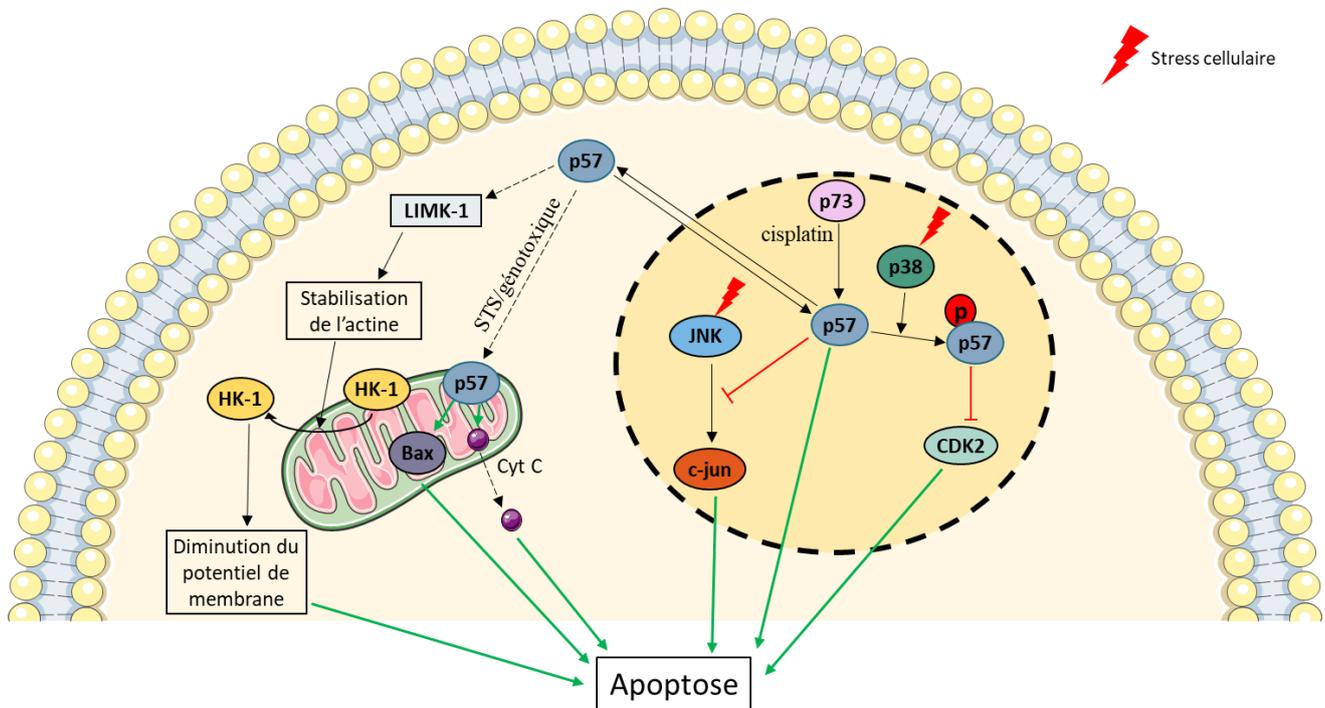


Figure 27 : Régulation de l'apoptose par p57

p57 peut indirectement inhiber l'apoptose via l'inhibition des CDK. Il possède également la capacité de moduler directement la réponse apoptotique de façon indépendante des CDK. p57 inhibe l'apoptose médiée par la voie JNK/SAPK via son domaine QT. Inversement p57 sensibilise à l'apoptose après un traitement cytotoxique via l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. p57 est également impliqué dans la réponse apoptotique médiée par p73 β .

2.3. Régulation de la transcription

De la même façon que les autres membres de la famille Cip/Kip, p57 peut réguler la transcription indirectement par l'inhibition des complexes cyclines/CDK, ce qui empêche la phosphorylation des protéines Rb et l'activation de E2F. Cependant p57 peut également réguler l'activité de facteurs de transcription en les liant directement.

En effet, p57 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de b-Myb de façon indépendante des CDK, mais en se fixant directement sur b-Myb (Joaquin and Watson, 2003). p57 est également impliqué dans la régulation de la stabilité du facteur de transcription bHLH, MyoD. La phosphorylation de MyoD par CDK2 sur la sérine 200 entraîne une diminution de sa stabilité, l'inhibition des CDK par p57 résulte donc en une augmentation de stabilité de

MyoD, favorisant ainsi la différenciation musculaire (Reynaud et al., 1999). p57 est également capable de stabiliser MyoD indépendamment de l'inhibition des CDK en interagissant directement via sa partie N-terminale et au niveau de son domaine hélice 3₁₀, avec MyoD, ce qui protège MyoD de la dégradation et permet la transactivation de gènes musculaires (Reynaud et al., 2000b).

De façon similaire, p57 peut interagir directement avec d'autres facteurs de transcription bHLH comme Ascl1/Mash1, NeuroD et Atoh2/Math2 dans les progéniteurs neuronaux. p57 agit alors comme un répresseur transcriptionnel et inhibe directement l'activité d'Ascl1 de façon indépendante des CDK, en se fixant au niveau des promoteurs cibles d'Ascl1, modulant ainsi la différenciation neuronale (Joseph et al., 2009). De façon similaire, p57 peut moduler l'activité transcriptionnelle de Nurr1 de façon indépendante des CDK au cours de la maturation des neurones dopaminergiques (Joseph et al., 2003).

Enfin, p57 est également capable de réprimer l'activité de l'ARN polymérase II via son interaction avec E2F1. L'interaction avec E2F1 permet le recrutement de p57 au niveau de l'ADN où il inhibe CDK7 et CDK9, ce qui entraîne une diminution de phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II et résulte en une diminution de la transcription (Ma et al., 2010). De plus, dans l'interactome réalisé au sein de l'équipe, de multiples partenaires impliqués dans la régulation de transcription ont été identifiés, dont de nombreux facteurs de transcription ou encore HDAC7 (histone déacétylase 7), suggérant que p57 joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription (Duquesnes et al., 2016).

2.4.Régulation de la différenciation

p57 joue un rôle primordial dans la différenciation de nombreux types cellulaires en favorisant la sortie du cycle cellulaire via l'inhibition des CDK, ou par des fonctions indépendantes des CDK. En effet, plusieurs phénotypes observés chez les souris p57^{KO} sont causés par un défaut de différenciation cellulaire (Zhang et al., 1997).

De nombreuses études ont montré que p57 régule différents aspects de la neurogénèse notamment en contrôlant la différenciation cellulaire dans le système nerveux central et aussi dans le système nerveux périphérique. p57 est présent dans les cellules souches neurales et contrôle leur détermination et leur différenciation (Jadasz et al., 2012), p57 promeut la différenciation des astrocytes au dépend de la différenciation des oligodendrocytes (Jadasz et al., 2012). Au niveau du système nerveux périphérique, p57 inhibe la différenciation des cellules de Schwann, en effet sa suppression par shRNA entraîne une sortie du cycle cellulaire,

une croissance et une différenciation cellulaire ainsi qu'une augmentation de la production de myéline (Heinen et al., 2008a). De la même façon, au niveau du système nerveux central, p57 inhibe la différenciation des oligodendrocytes, et la suppression de p57 accélère leur différenciation (Kremer et al., 2009). Ces résultats sont controversés, en effet il a été montré *in vitro* dans des cellules primaires de rat et *in vivo* dans le poisson zèbre que p57 favorise la différenciation des progéniteurs oligodendrocytaires (Dugas et al., 2007; Park et al., 2005). Au cours de la différenciation des oligodendrocytes, une relocalisation cytoplasmique de p57 est observée. Dans le noyau, p57 interagit et inhibe Ascl1 (Joseph et al., 2009), un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des oligodendrocytes, alors que dans le cytoplasme p57 interagit avec LIMK1 et CDK2. L'export nucléaire de p57 favorise la différenciation, probablement grâce à ses différentes interactions cytoplasmiques et à une levée de l'inhibition d'Ascl1. La relocalisation de p57 entraîne également un export de Hes5 ce qui l'inhibe et renforce l'effet pro-différenciatif de p57 cytoplasmique (Gottle et al., 2015). Il semblerait donc que l'effet de p57 sur la différenciation des oligodendrocytes soit dépendant de sa localisation subcellulaire. En plus de ces types cellulaires, p57 est impliqué dans la différenciation des neurones dopaminergiques en coopérant avec Nurr1 (Joseph et al., 2003), ou dans le développement des neurones amacriens de la rétine (Pounds and Dyer, 2008).

p21 et p57 coopèrent et sont requis *in vivo* pour la différenciation terminale des muscles squelettiques. Les souris double KO p21^{-/-}p57^{-/-} présentent une altération de la différenciation des muscles squelettiques se manifestant par des défauts de formation des myotubes et une augmentation de la prolifération et de l'apoptose des myoblastes (Zhang et al., 1999). L'expression de p57 augmente au cours de la différenciation musculaire et est induite par le facteur myogénique MyoD, de façon indirecte via l'induction de p73 qui augmente l'expression de p57, créant ainsi une boucle d'autorégulation positive, puisque à son tour p57 stabilise MyoD, favorisant la myogenèse (Vaccarello et al., 2006). Les facteurs de transcription SP1 et EGR1 participent également à l'induction de p57 au cours de la différenciation myogénique (Figliola et al., 2008). Enfin MyoD peut stimuler directement l'expression de p57 via un mécanisme épigénétique, MyoD se fixe au niveau d'un élément de régulation négatif, ce qui entraîne un remodelage de la chromatine et une levée de l'inhibition de l'expression de p57 (Busanello et al., 2012). Dans les rhabdomyosarcomes, la protéine chimérique PAX3-FOXO1 inhibe indirectement la transcription de p57 via la déstabilisation de EGR1, ce qui empêche la différenciation des myoblastes. La réexpression de p57 dans ces cellules est suffisante pour restaurer la différenciation myogénique (Roeb et al., 2007).

p57 participe également à la différenciation des chondrocytes. La différenciation hypertrophique des chondrocytes est requise pour le processus d'ossification, les chondrocytes différenciés sont caractérisés par l'expression de collagène X, une forte activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'une augmentation du volume cellulaire (Stewart et al., 2004). Les souris p57^{KO} présentent un raccourcissement osseux et un délai d'ossification causé par un défaut de différenciation des chondrocytes visible grâce à une augmentation de la prolifération ainsi qu'une diminution de l'expression de collagène X. L'expression de p57 augmente au cours de la différenciation, ce qui entraîne un arrêt de la prolifération (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). L'expression de p57 est stimulée par C/EBP β (Hirata et al., 2009) et en plus de ses fonctions d'inhibiteur du cycle cellulaire, p57 potentialise l'induction du Collagène X médiée par BMP2 (Stewart et al., 2004).

Enfin, la voie de signalisation Notch/Hes1 inhibe l'expression de p57 dans plusieurs tissus afin de favoriser la prolifération des progéniteurs et d'empêcher la sortie du cycle cellulaire et donc une différenciation précoce notamment dans l'intestin (Riccio et al., 2008), le pancréas (Georgia et al., 2006) ou encore le cristallin (Jia et al., 2007).

2.5.Régulation des cellules souches

Plusieurs études récentes ont révélé un rôle de p57 dans le maintien de la quiescence des cellules souches adultes dans un certain nombre de tissus.

L'hématopoïèse requière le maintien d'une population de cellules souches hématopoïétiques quiescentes et multipotentes. p57 est le CKI le plus abondant dans les cellules souches hématopoïétiques et est requis pour leur maintenance (Matsumoto et al., 2011). En effet, la perte de p57 chez l'adulte grâce à un modèle de souris knockout conditionnelle, entraîne une diminution du pool de cellules souches causée par une sortie de quiescence (G₀) et leur entrée en apoptose. La capacité de reconstitution du système hématopoïétique après transplantation est également diminuée en l'absence de p57 (Matsumoto et al., 2011). Ces défauts de l'hématopoïèse peuvent être corrigés par l'expression de p27 dans le locus p57 (knock-in p57^{p27KI}) (Matsumoto et al., 2011). De plus, dans les cellules souches hématopoïétiques fœtales du foie, la perte de p57 est compensée par une augmentation de l'expression de p27 (Zou et al., 2011). Par ailleurs, l'inactivation de p21 ou p27 n'entraîne aucun défaut des cellules souches, ce qui suggère donc que p57 est le principal CKI requis pour la maintenance des cellules souches hématopoïétiques (Matsumoto et al., 2011). De manière cohérente, le facteur TGF- β 1 induit la quiescence des cellules souches hématopoïétiques et augmente p57 (Yamazaki et al.,

2009). Inversement, l'augmentation de Skp2 et donc la diminution de p57, est nécessaire à la reprise du cycle cellulaire dans ces cellules (Rodriguez et al., 2011). Le rôle de p57 dans le contrôle de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques implique son interaction avec la protéine chaperonne Hsc70. L'association entre p57 et Hsc70 entraîne une séquestration cytoplasmique du complexe Hsc70/Cycline D1, ce qui inhibe l'entrée dans le cycle cellulaire. De la même manière, p27 est capable d'interagir avec Hsc70 afin de compenser la perte de p57 (Zou et al., 2011).

Au niveau du poumon, l'homéostasie et la régénération tissulaire sont soutenues par les cellules souches pulmonaires résidentes appelées BASCs (Bronchioalveolar Stem Cells). L'autorenouveaulement de ces cellules souches nécessite une régulation précise du niveau d'expression de p57. En effet, dans les deux cas, une perte ou une augmentation du niveau d'expression de p57 dans les BASCs cause un défaut d'autorenouveaulement entraînant une altération de la régénération tissulaire (Zacharek et al., 2011). Ces résultats soulignent l'importance de l'empreinte et de l'expression monoallélique de p57. L'expression de p57 et de nombreux gènes soumis à empreinte est contrôlée par Bmi1 au niveau du poumon, cependant aucun défaut de méthylation n'a été observé en absence de Bmi1. Il semblerait donc que Bmi1 soit plutôt associé à l'expression de l'allèle des gènes soumis à l'empreinte (Zacharek et al., 2011). Par contre le mécanisme par lequel p57 régule le maintien des BASCs n'a pas été étudié.

Dans le cerveau adulte, p57 est exprimé dans les cellules souches neurales quiescentes mais est absent dans les progéniteurs prolifératifs. La présence de p57 est requise pour le maintien de la quiescence des cellules souches. En effet, sa délétion entraîne à court terme une augmentation de la prolifération des cellules souches et stimule la neurogénèse. Mais à plus long terme, la perte de p57 entraîne un épuisement du pool de cellules souches neurales et aboutit à une altération de la neurogénèse (Furutachi et al., 2013). De façon similaire, au cours du développement, les embryons p57^{KO} présentent une macroencéphalie causée par une augmentation de la prolifération des progéniteurs et des cellules souches neurales (Mairet-Coello et al., 2012). Chez la drosophile, les cellules souches neurales peuvent adopter deux types de quiescence, G₀ et G₂ (75 % des cellules souches). Les cellules en G₂ peuvent être rapidement activées et se diviser en réponse à des stimuli nutritionnels, alors que les cellules en G₀ répondent plus lentement. Le choix entre les quiescences G₀/G₂ est déterminé au stade embryonnaire et dépend de p57 qui favorise l'entrée en G₀ au dépend de G₂. La délétion de p57

entraîne un changement du destin des cellules souches neurales qui s'orientent alors préférentiellement vers l'état de quiescence G₂ (Otsuki and Brand, 2019).

Dans le muscle squelettique en développement, l'inhibition de p57 est requise pour le maintien de certaines cellules souches et progéniteurs. Notch inhibe l'expression de p57 dans les progéniteurs musculaires Pax3^{+/7+} via Hes1, permettant ainsi l'amplification du pool de progéniteurs. La perte de la signalisation Notch entraîne une augmentation de l'expression de p57 dans ces progéniteurs, ce qui est associé avec une différenciation précoce et une déplétion des progéniteurs musculaires (Zalc et al., 2014). Dans le muscle adulte, les cellules souches adultes, appelées cellules satellites, dérivent des progéniteurs Pax3^{+/7+} et sont mobilisées en cas de dommages afin de pouvoir régénérer les fibres musculaires. De manière surprenante, p57 n'est pas exprimé dans les cellules souches quiescentes mais est induit pendant leur mobilisation (Mademtzoglou et al., 2018). De plus, il a été montré *in vivo*, que la perte de p57 entraîne une augmentation de la prolifération et de l'autorenouveaulement des progéniteurs et myoblastes au dépend de leur différenciation. Suite à des dommages, l'absence de p57 entraîne une déplétion des cellules satellites et un retard de régénération (Mademtzoglou et al., 2018).

Enfin, la présence de p57 a été détectée dans les cellules souches quiescentes du follicule pileux (Leishman et al., 2013) ainsi que dans les cellules intestinales CBC quiescentes Mex3a^{High} (Barriga et al., 2017).

Conclusion

p57 a la particularité d'être le seul inhibiteur de CDK requis pour le développement embryonnaire. Depuis sa découverte en tant qu'inhibiteur de CDK, un nombre croissant d'études ont montré que p57 est impliqué dans de nombreux processus cellulaires dont la différenciation, l'apoptose, la régulation transcriptionnelle ou encore le maintien de la quiescence des cellules souches. La génération d'un modèle de souris knock-in p57^{CK-} a fourni la preuve génétique que certaines de ces fonctions sont indépendantes des cyclines/CDK au cours du développement, cependant les mécanismes sous-jacents restent largement à identifier.

Chapitre 3 : modèles de culture pour l'ingénierie tissulaire

La fonction tissulaire est déterminée à la fois par les composants cellulaires et non cellulaires. En effet, à l'intérieur d'un tissu, les cellules interagissent entre-elles et avec la matrice extracellulaire via des signaux biochimiques et mécaniques créant un réseau de communications en trois dimensions. Cependant, jusqu'à présent, la plupart des études *in vitro* ont été réalisées sur des modèles à deux dimensions, ne reconstituant pas la complexité présente *in vivo*. Afin de contourner ces limites, un nombre croissant de modèles 3D sont développés, notamment avec l'avènement des cultures en organoïdes/sphéroïdes, puis grâce à l'ingénierie tissulaire.

Le terme d'ingénierie tissulaire a été initialement défini en 2000 par Robert Langer comme un « domaine interdisciplinaire qui s'applique sur les principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour le développement de substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction tissulaire » (Langer, 2000). L'ingénierie tissulaire est principalement basée sur la construction de supports de culture, qui reproduisent certaines spécificités de l'environnement natif d'un point de vue structurel, chimique et mécanique et qui permettraient donc de cultiver les cellules dans des conditions plus représentatives des tissus *in vivo* (Ramanan et al., 2014).

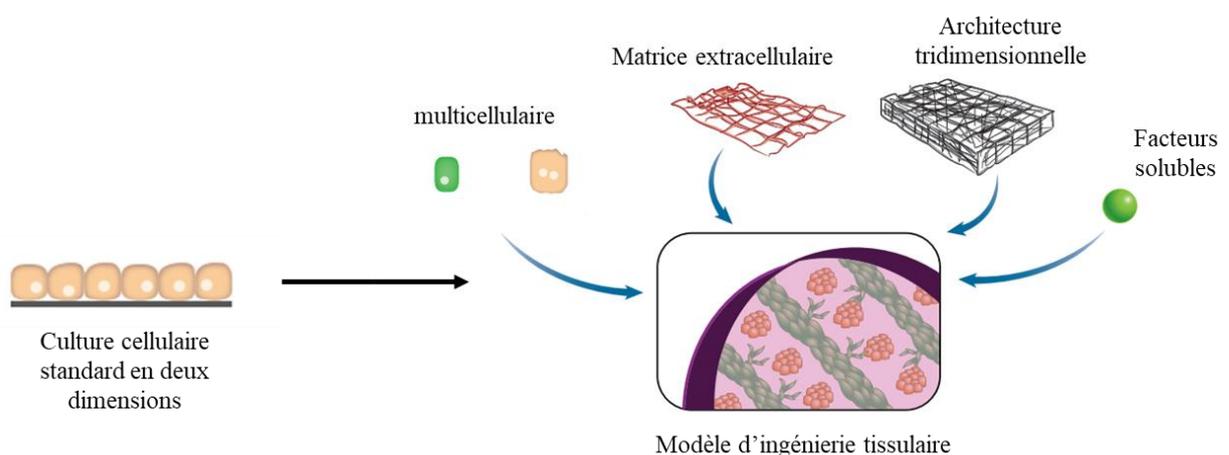


Figure 28: L'ingénierie tissulaire pour récapituler la complexité du vivant

Les conditions de culture standard consistent en une culture cellulaire monocouche sur plastique. L'ingénierie tissulaire a pour but de modéliser la complexité des systèmes de culture en intégrant différents composants : plusieurs types cellulaires, la matrice extracellulaire, l'architecture 3D et l'environnement biochimique. (D'après Ramanan V et al., 2014).

I. De la culture 2D au modèles 3D

1. Evolution vers les modèles de culture 3D

Depuis les débuts de la culture cellulaire, les supports de culture les plus couramment utilisés pour soutenir la croissance cellulaire restent des surfaces plates en polystyrène ou en verre. Cependant, de nombreuses études ont montrées que les cultures en 2 dimensions ne sont pas représentatives des conditions de prolifération et de croissance cellulaire *in vivo*. C'est pourquoi les cultures cellulaires ont progressivement évoluées d'un modèle en 2 dimensions vers des modèles en 3 dimensions (Simian and Bissell, 2017). Les premières cultures 3D datent du début des années 1900. En 1907, Ross Harrison a développé le système de gouttes renversées afin d'étudier et de récapituler l'organogénèse et le développement des fibres nerveuses. A partir de fragments de cordes neurales de grenouille placés dans une goutte de lymphe sur une lamelle de verre qui est ensuite renversée et scellée, ce qui permet l'agrégation des cellules, il a observé la croissance de fibres nerveuses et a maintenu ces cultures jusqu'à 4 semaines (Harrison et al., 1907). La même année, H.V. Wilson a démontré la capacité d'auto-organisation de cellules d'éponge après dissociation afin de régénérer un organisme entier (Wilson, 1907). Ces deux expériences pionnières ont posé les bases des cultures 3D encore utilisées aujourd'hui.

L'évolution des modèles de culture a également bénéficiée de l'avancement de la compréhension et de la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire. Suite à la reconstitution de collagène extrait de queue de rat, il a été montré, sur 29 lignées cellulaires différentes, que la culture sur une couche de collagène en 2 dimensions améliore fortement la prolifération cellulaire et entraîne également une augmentation de l'adhésion, de l'élongation et de la migration cellulaire (Ehrmann and Gey, 1956). Dans les années suivantes, ces résultats ont été confirmés avec de nombreux types cellulaires, dont des cellules primaires d'hépatocytes embryonnaires et adultes, cependant après quelques jours de cultures ces hépatocytes perdent leur fonction de cellules différenciées (Bissell and Tilles, 1971). Il a été montré que de cultiver des cellules sur des gels flottants de collagène plutôt que sur une couche 2D permettait de maintenir la fonction cellulaire et l'état de différenciation. En effet, si après ensemencement le gel de collagène est détaché du fond de la boîte, les cellules s'agrègent alors autour de ce gel flottant, ce qui permet d'augmenter leur viabilité et de conserver certaines fonctions des hépatocytes différenciés (Michalopoulos and Pitot, 1975). Ces observations ont été confirmées avec des cellules épithéliales mammaires. Les cellules cultivées sur des gels de collagène en suspensions maintiennent certaines caractéristiques de cellules différenciées (polarisation avec

présence de microvillosités, expression de protéines de lait, et réticulum endoplasmique très développé) jusqu'à un mois de culture (Emerman and Pitelka, 1977). De manière similaire, il a été montré que la culture de cellules épithéliales mammaires ou rénales entre deux couches de collagènes de type I permettait l'organisation et la polarisation des cellules avec la formation de lumières semblable aux tubules ou aux acini (Hall et al., 1982). En parallèle à ces études sur le collagène, une tumeur murine de chondrosarcome, appelée EHS, a été identifiée comme étant une source importante de matrice extracellulaire contenant du collagène de type IV et très riche en laminine (Orkin et al., 1977 ; Timpl et al., 1979). Cette matrice extracellulaire est aujourd'hui connue sous le nom commercial de Matrigel (Kleinman and Martin, 2005). La culture en Matrigel promeut la différenciation de nombreux types cellulaires et favorise également la croissance de cellules primaires. A l'heure actuelle, la culture de cellules en Matrigel reste l'un des moyens les plus utilisés pour la génération de modèles 3D (Kleinman and Martin, 2005). En 1975, la première culture long terme de cellules primaires humaines a été mise au point. Des kératinocytes humains ont été co-cultivés avec des fibroblastes immortalisés 3T3, ce qui permet la formation d'un épithélium stratifié similaire à l'épiderme, avec les cellules prolifératives dans la couche basale et une kératinisation des couches supérieures. Ce modèle représente la première reconstitution 3D d'un tissu à partir de cellules cultivées (Rheinwald and Green, 1975). Toutes ces expériences ont permis d'établir les bases et les outils pour le développement des modèles de culture 3D et des organoïdes.

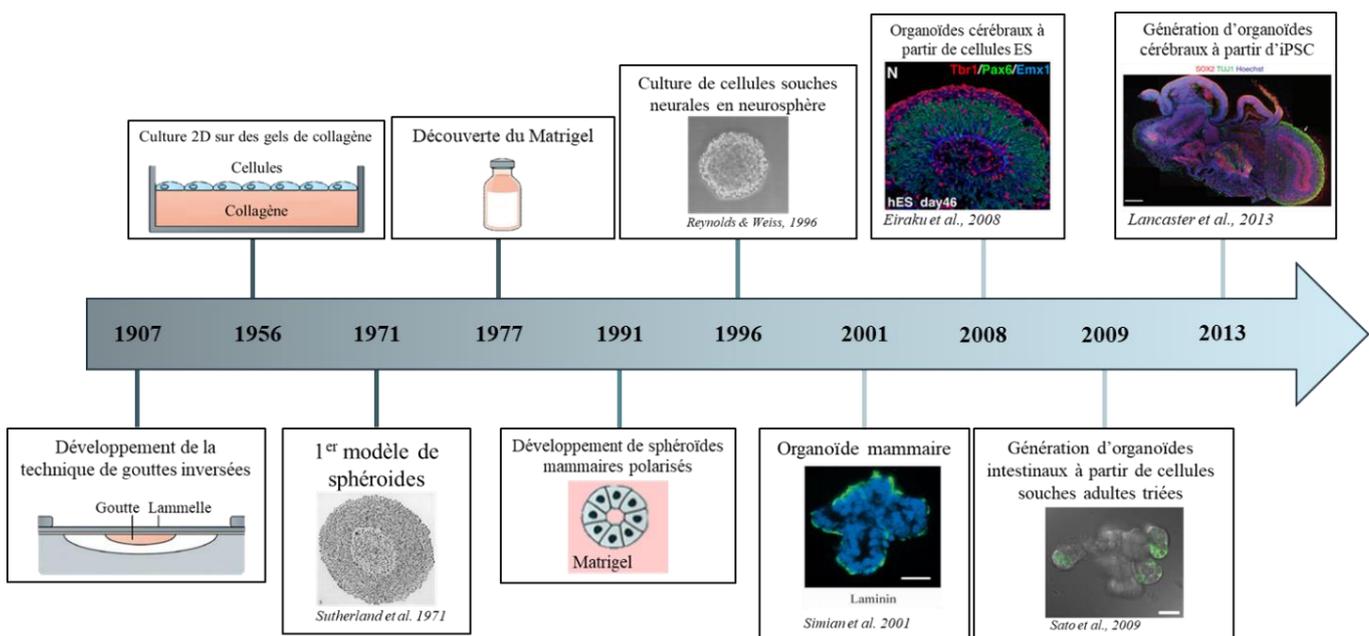


Figure 29 : Evolution des modèles de culture cellulaires vers les modèles 3D

2. Sphéroïdes et organoïdes

Les sphéroïdes sont des cultures 3D simples qui exploitent la tendance naturelle de nombreux types cellulaires à s'agréger. La plupart des sphéroïdes sont générés par la technique de la goutte renversée, en ensemencement des cellules dans des conditions non adhérentes, ou encore en maintenant les cultures sous agitation, les cellules vont alors s'agréger entre elles et se compacter pour former des structures rondes qui peuvent être maintenues en suspension (Pampaloni et al., 2007; Weiswald et al., 2015). Le premier modèle de sphéroïde date de 1971, des cellules pulmonaires de hamster V79 ont été cultivées sous agitation ce qui permet la formation d'agrégats cellulaires en quelques heures, les sphères se développent ensuite grâce à la prolifération des cellules. Dès que le diamètre des sphéroïdes est supérieur à 200 μm , les cellules s'organisent en 3 zones : une couche extérieure proliférative, une couche intermédiaire contenant peu de cellules et qui prolifèrent lentement et un cœur nécrotique, ce qui récapitule l'organisation des tumeurs *in vivo* (Sutherland et al., 1971). Depuis, des sphéroïdes ont été développés avec de nombreuses lignées cellulaires et leur facilité d'obtention, leur capacité à récapituler les conditions de croissance tumorale, ainsi que leur organisation concentrique qui mime la disponibilité des capillaires sanguins par rapport aux cellules tumorales, en font donc un modèle de choix pour les tests d'agents anti-cancéreux (Friedrich et al., 2007; LaBarbera et al., 2012). Ces modèles de cultures ont également permis d'accroître la compréhension des interactions entre les cellules et avec leur microenvironnement, notamment avec la matrice extracellulaire. La première preuve que la matrice influe directement sur l'expression des gènes via les intégrines est issue d'un modèle de culture où des cellules primaires mammaires isolées incluses en Matrigel sont capables de s'auto-organiser et de synthétiser la β -caséine, ce qui est abolit en présence d'un anticorps bloquant anti-intégrine $\beta 1$ (Streuli et al., 1991). Ce modèle de culture a permis de distinguer les cellules normales des cellules cancéreuses. Les cellules primaires normales cultivées en Matrigel prolifèrent dans un premier temps, puis deviennent quiescentes, s'auto-organisent, se polarisent et se différencient pour former des structures tubulaires similaires à celles observées *in vivo*. Inversement les cellules cancéreuses continuent de proliférer et ne sont pas capables d'organisation ou de différenciation (Petersen et al., 1992). Il a ensuite été montré que ce phénotype cancéreux peut être rétabli par inhibition de l'intégrine- $\beta 1$ (Weaver et al., 1997) et de l'EGFR (Wang et al., 1998). De façon intéressante, il existe une régulation réciproque entre ces deux récepteurs, favorable à la différenciation, qui n'a pas été observée en 2D, (Wang et al., 1998), soulignant l'importance et la pertinence de l'utilisation des modèles de culture 3D.

Afin d'étudier les mécanismes de morphogénèse mammaire, des cellules primaires obtenues à partir de glandes inguinales mammaires murines dissociées ont été incluses dans un gel de collagène de type I. Les différents types cellulaires s'auto-organisent dans le gel pour former des structures polarisées avec une lumière centrale bordées des cellules épithéliales et myoépithéliales, entourées d'une membrane basale et récapitulant les événements de morphogénèse observées *in vivo* (Simian et al., 2001). Cette étude a permis de mettre en évidence que la morphogénèse dépend de l'activité des métalloprotéases ainsi que des facteurs de croissance et morphogènes (Simian et al., 2001). Ce modèle constitue l'un des premiers modèles d'organoïdes développés.

Le terme organoïde (littéralement « qui ressemble à un organe ») implique que ces cultures sont multicellulaires, possèdent une fonctionnalité et sont organisées spatialement (Lancaster and Knoblich, 2014). Les organoïdes sont définis comme des cultures organotypiques qui se développent à partir de progéniteurs, de cellules souches primaires ou de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) ; qui s'auto-renouvèlent, s'auto-organisent et s'engagent dans un lignage de différenciation restreint dans l'espace, de manière similaire au développement *in vivo* et démontrent certaines fonctionnalités similaires au tissu d'origine (Fatehullah et al., 2016; Lancaster and Knoblich, 2014). Le champ de recherche sur les organoïdes s'est largement développé grâce aux progrès réalisés en biologie des cellules souches. La première lignée de cellules souches embryonnaires (ES) humaines a été établie en 1998 à partir de blastocystes (Thomson et al., 1998). Il a également été montré qu'il est possible de cultiver et d'amplifier des cellules souches neurales embryonnaires primaires en suspensions sous forme de neurosphères. Dans ces conditions de cultures, les progéniteurs neurales conservent leur capacité d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation vers plusieurs lignages (Reynolds and Weiss, 1996). Des cellules souches mammaires sont capables de proliférer dans les mêmes conditions de culture et de former des mammosphères (Dontu et al., 2003). Toutes ces études ont mené au développement des modèles organoïdes.

En 2008, des organoïdes cérébraux ont été générés à partir de cellules souches embryonnaires pluripotentes. Après dissociation, les cellules sont ensemencées dans des conditions de culture non adhérente et s'agrègent. Les cellules agrégées s'auto-organisent, se différencient et les structures récapitulent la corticogénèse et l'organisation du cortex cérébral et exhibent certaines fonctions tissulaires telle que le flux calcique (Eiraku et al., 2008). Les mêmes cellules cultivées en présence de Matrigel s'auto-organisent pour former des cupules optiques et des neurones rétiniens (Eiraku et al., 2011). Les cellules souches adultes sont

également capables de former des organoïdes. En 2009, des organoïdes intestinaux ont été établis à partir de cellules souches Lgr5⁺ triées. Il a été démontré qu'une cellule isolée incluse en Matrigel est capable de proliférer, et permet de générer des structures 3D organisées en cryptes/villosités bordant une lumière centrale contenant les cellules mortes excluent de l'épithélium au cours du renouvellement. Les cellules prolifératives sont localisées au niveau des structures de type cryptes et migrent dans les structures de type villosités au cours de leur différenciation, tous les types cellulaires de l'intestin sont retrouvés dans ces organoïdes (Sato et al., 2009). Enfin, en 2013, des organoïdes cérébraux ont été générés à partir de cellules souches induites dérivées de fibroblastes de patients atteint de microcéphalie (Lancaster et al., 2013). Depuis ces premières études, de nombreux organes ont été modélisés sous la forme d'organoïdes à partir de sources cellulaires variées (Fatehullah et al., 2016).

Les organoïdes représentent donc des modèles puissants permettant de mimer l'organisation, la morphogénèse et l'hétérogénéité tissulaire. Cependant, ils présentent également certaines limites, notamment liées à l'impossibilité de créer des gradients (facteurs de croissance, cytokines, matrice...), de mimer les forces mécaniques, ainsi que l'absence d'interaction avec d'autres cellules du microenvironnement. Les organoïdes sont également dépendant du Matrigel, un produit d'origine animale dont la qualité est très hétérogène suivant les lots et l'origine, ce qui introduit une grande variabilité dans ce modèle (Fatehullah et al., 2016 ; Yin et al., 2016). Il est également important de noter que l'architecture tridimensionnelle n'est pas conservée dans ces modèles de culture. C'est pourquoi, il est intéressant de développer des modèles alternatifs. L'une des possibilités est l'utilisation d'explants tissulaires qui sont des fragments d'organes cultivés *in vitro*, ce qui permet de conserver l'architecture, l'hétérogénéité et la fonction tissulaire. Cependant il est difficile de maintenir ces explants en culture pour de longues durées du fait de la faible diffusion des nutriments, de l'oxygène et des facteurs de croissance à travers le tissu (Shamir and Ewald, 2014).

Dans ce contexte, il y a un intérêt grandissant pour l'ingénierie tissulaire et l'utilisation d'approches multidisciplinaires afin de créer des systèmes de culture plus physiologiques de manière contrôlée et standardisée (Rossi et al., 2018).

II. Apport des techniques de microfabrication en ingénierie tissulaire

Les technologies de microfabrication tel que la photolithographie, le dépôt par contact (microcontact printing), le moulage, l'impression 3D ou encore la microfluidique offrent de

multiplés possibilités afin de créer des modèles de cultures plus physiologiques et plus représentatifs que les modèles actuellement disponibles (Huh et al., 2011).

1. Microstructuration de modèles de culture

Alors que les organoïdes sont basés sur l'auto-organisation cellulaire en 3D, l'une des approches majeures de l'ingénierie tissulaire est la reproduction de l'architecture tissulaire afin de permettre une organisation guidée des cellules.

Plusieurs technologies peuvent être utilisées pour contrôler la topographie, la distribution spatiale de molécules ou de cellules. Une approche simple à mettre en place est l'approche par lithographie douce. La lithographie douce est un ensemble de techniques de microfabrication basées sur l'utilisation de timbres ou tampons en PDMS (polydiméthylsiloxane), un élastomère, afin de structurer des matériaux, ou de transférer des motifs de protéines ou de polymères (microcontact printing) (**Figure 30**) (Huh et al., 2011).

L'une des premières contributions des techniques de microfabrication dans des modèles biologiques est l'utilisation du microcontact printing pour contrôler l'adhésion, la distribution spatiale, la migration et l'organisation des cellules. Le dépôt de motifs de matrice extracellulaire sur des surfaces non adhésives permet de contraindre les cellules à adhérer uniquement sur ces îlots adhésifs, empêche la migration et contrôle la morphologie cellulaire (Singhvi et al., 1994). Une diminution de la prolifération d'hépatocytes cultivés sur des motifs, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'albumine en comparaison à une culture sur une surface non structurée a été observée (Singhvi et al., 1994). De la même manière, des cellules endothéliales, cultivées sur des îlots de faible diamètre (<10 µm), sont rondes et entrent en apoptose, alors que les cellules cultivées sur une surface plus importante s'étalent et prolifèrent (Chen et al., 1997). Le microcontact printing a également été utilisé pour l'orientation des cellules cardiaques afin de générer des fibres myocardiques organisées avec des fibres d'actine alignées le long de la cellule, une élongation du noyau et un arrangement des sarcomères parallèles, similaire à l'organisation observée *in vivo* (Bursac et al., 2002).

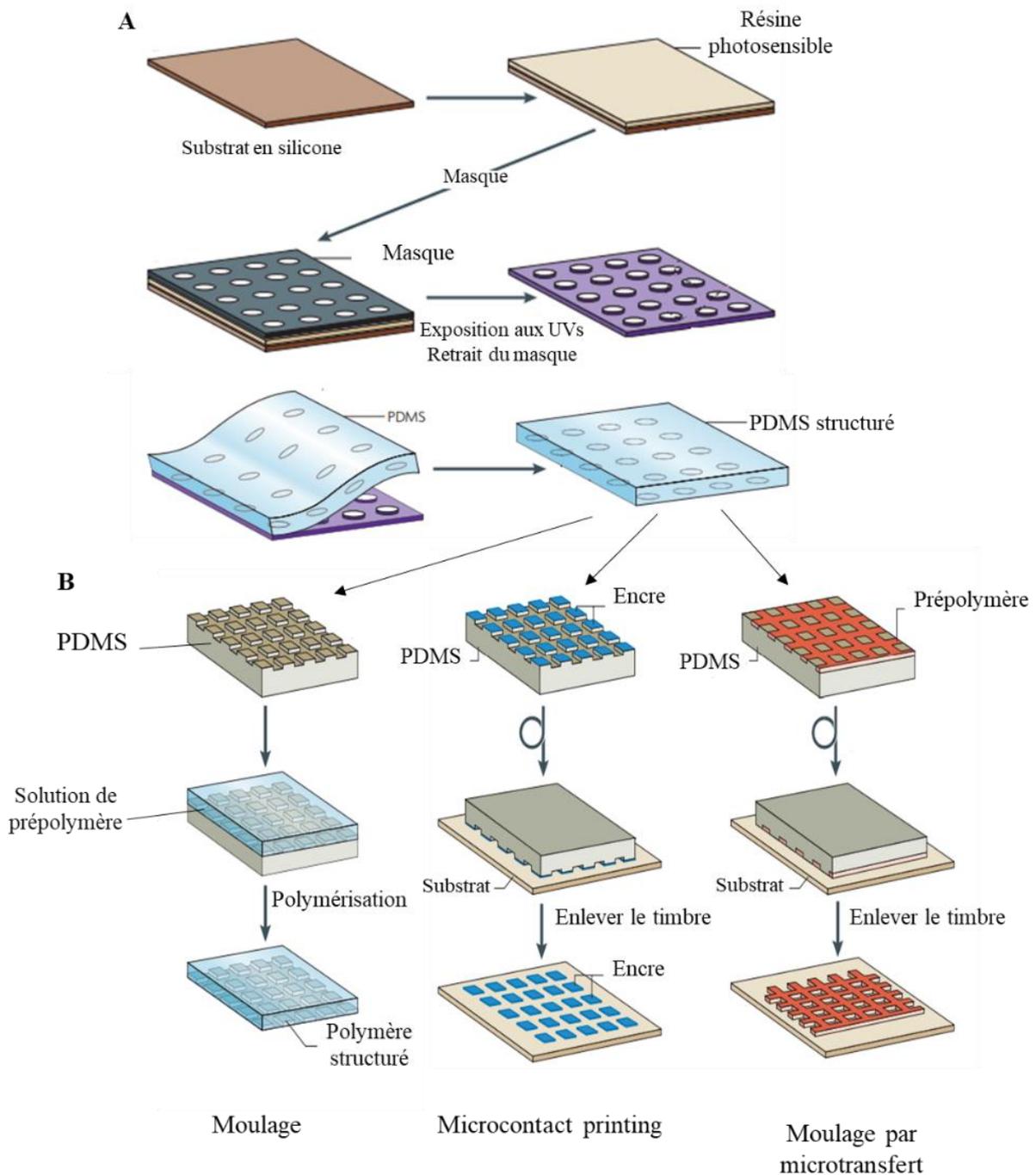


Figure 30 : Les techniques de lithographie douce

Le timbre ou tampon de PDMS est fabriqué par un procédé de lithographie (A), une résine photosensible est déposée en couche fine sur un substrat en silicone, un masque optique est ensuite déposé sur la résine. Le masque est généralement en verre transparent avec des motifs opaques en chrome. L'ensemble est ensuite exposé aux UVs, la résine polymérise à travers le masque, une fois le masque retiré, l'étape de développement permet de structurer la résine selon les motifs souhaités, ce qui permet de mouler le timbre de PDMS. Ce timbre est ensuite utilisé pour diverses applications (B). Il peut être utilisé pour du moulage, par exemple pour la polymérisation d'un polymère qui permet la reproduction du motif du timbre en négatif. Le microcontact printing consiste à transférer le motif sur un substrat, plusieurs types d'encres peuvent être utilisées notamment des protéines de la matrice, l'encre est déposée sur les motifs, séchée puis le timbre est inversé sur la surface du substrat, lorsque le timbre est retiré les protéines restent sur le substrat. Enfin, le même principe peut être utilisé pour faire du moulage par microtransfert en utilisant une encre formée de polymère. (Weibel et al., 2007)

Alors que la plupart des approches décrites précédemment restent limitées à une structuration planaire (2D), les technologies de lithographie douce peuvent également être utilisées pour modifier la topographie des surfaces de culture (**Figure 30**), ce qui peut fortement influencer le comportement cellulaire. Par exemple, la culture de myocytes sur des membranes micro-texturées (sillons de 5 μm de profondeur et 20 μm de largeur), permet l'alignement des cellules, une augmentation de leur taille, et l'acquisition d'une morphologie ressemblant aux cellules *in vivo* (Deutsch et al., 2000). La culture sur des surfaces micro ou nano structurées influence également la migration (Teixeira et al., 2003), l'adhésion ou encore la prolifération cellulaire (van Kooten et al., 1998). Toutes ces études soulignent l'importance de la topographie dans les modèles de culture cellulaire.

Une autre approche permettant de combiner à la fois fonctionnalisation et structuration de surface est le « in-mold patterning ». Cette technique consiste à transférer simultanément des motifs protéiques et des microstructures d'un moule au substrat final. Dans ce cas, la protéine est déposée sur la partie saillante des microstructures du moule (Yamada et al., 2016). Cette approche a été utilisée afin de générer des supports de culture microstructurés en lignes droites de 5 μm de profondeur, 1 mm de long et de largeur variable (5, 10, 20, 40 et 80 μm), et un dépôt de Poly-L-Lysine uniquement dans le fond de ces sillons, laissant les parois des structures et la surface supérieure non adhésive. Les supports ont ensuite étéensemencés avec des cellules neurales et cette géométrie particulière combinée au traitement de surface permet un confinement et le guidage axonal plus reproductible et plus efficace qu'avec les techniques classiques de microstructuration et de microcontact printing (Yamada et al., 2016).

Afin de reproduire la topographie tissulaire, l'approche la plus utilisée est la génération d'un support de culture ou scaffold (le terme de scaffold sera utilisé dans la suite de ce manuscrit) reproduisant l'architecture tissulaire. Le scaffold a également pour but de fournir un environnement favorable à la croissance cellulaire de par ses propriétés biochimiques, mécaniques et topographiques. De la même manière que les tissus, l'architecture du scaffold doit permettre une colonisation optimale par les cellules, et doit donc offrir une surface importante d'adhésion, interconnectée avec une porosité adaptée, des propriétés mécaniques et une forme tridimensionnelle spécifique au type cellulaire.

Selon leur application, il existe deux types de scaffolds : des scaffolds destinés à l'implantation et à la médecine régénérative, le scaffold est, dans ce cas, souvent dégradable. Ou alors des scaffolds destinés à la culture cellulaire *in vitro* afin d'étudier des mécanismes

biologiques fondamentaux, dans ce cas la dégradabilité du scaffold n'est pas nécessaire (Yuan et al., 2018). Hormis cette différence, les propriétés mécaniques, chimiques, l'architecture et les techniques de fabrication sont similaires dans les deux cas.

Plusieurs technologies permettent la génération de scaffolds. Une approche simple, est la création d'un moule de PDMS par lithographie, l'avantage de cette technique est qu'un seul masque peut être utilisé pour fabriquer de nombreux moules en PDMS peu coûteux, robustes et réutilisables pour mettre en forme de nombreux matériaux avec une grande résolution. L'inconvénient de cette approche est le manque de flexibilité dans le choix de géométrie du scaffold qui reste généralement limité à des structures 2D ou 2,5D du fait de l'étape de moulage. En effet, le scaffold doit être formé de structures continues et il est difficile de fabriquer des structures poreuses ou suspendues. De plus de nombreuses étapes de fabrication sont nécessaires pour l'obtention du moule en PDMS (Vozzi et al., 2003).

2. L'impression 3D et la bioimpression pour la génération de support de culture

Une alternative pour la fabrication de scaffolds est l'impression 3D. L'impression 3D est une technique de fabrication additive permettant la mise en forme de pièces par ajout de matière ou empilement de couches successives permettant de reconstituer une structure tridimensionnelle. L'objet est dessiné numériquement à l'aide d'un logiciel de conception assisté par ordinateur (CAO), ce qui permet de générer un fichier STL (Standard Tessellation Language). Le fichier STL est traité par le logiciel de l'imprimante qui découpe l'objet en fines couches, qui sont ensuite imprimées successivement par l'imprimante 3D (Gross et al., 2014). L'impression 3D a de nombreux avantages, elle est rapide, permet l'impression de formes complexes (canaux, structures poreuses non connectées et structures suspendues) et est peu coûteuse en termes de fabrication (Gross et al., 2014). Les progrès réalisés dans les technologies d'impression en terme de résolution, ainsi que sur les biomatériaux utilisables ont permis d'adapter ces techniques pour l'impression directe de cellules, on parle dans ce cas de bioimpression (Murphy and Atala, 2014). Contrairement à l'impression de scaffolds formés de matériaux inertes, la bioimpression permet l'impression en 2 ou 3 dimensions de matériaux cellularisés appelés bioencres. La bioencres est composée d'un biomatériau mimant la matrice extracellulaire qui peut être directementensemencé avec des cellules vivantes. Une fois imprimées, les cellules prolifèrent, s'étalent et migrent, ce qui introduit la notion d'impression 4D où la quatrième dimension représente l'évolution au cours du temps de l'objet biologique fabriqué (Gao et al., 2016). Il existe plusieurs technologies d'impression 3D pour la

bioingénierie, dont la stéréolithographie, l'impression par traitement numérique de la lumière (DLP), l'impression par jet d'encre, l'extrusion ou l'impression assistée par laser, qui diffèrent suivant les matériaux utilisés et la résolution de l'impression (**Table 6**) (Gross et al., 2014; Murphy and Atala, 2014).

La stéréolithographie ou SLA (stereolithography apparatus) est la première technique d'impression 3D développée dans les années 1980. Elle est basée sur le principe de photopolymérisation d'un matériau (**Figure 31 A**). Il existe différentes configurations mais le principe d'impression reste le même. Un laser ou une lampe balaye la surface du matériau soit au travers d'un réservoir transparent soit à l'interface air-matériaux, ce qui entraîne la polymérisation d'une première couche de l'objet. Le laser est déplacé sur le matériau via des miroirs galvanométriques ou bien via des platines de translations, ce qui permet de contrôler sa position sur les axes x et y par ordinateur. L'objet est fabriqué sur une plateforme support, la polymérisation de la première couche permet l'accroche de l'objet sur la plateforme, et l'épaisseur de la couche est définie par la distance entre la plateforme d'impression et le haut ou le fond du réservoir. Une fois la première couche terminée, la plateforme, qui est mobile en z, remonte (ou descend suivant la configuration de l'imprimante), et la deuxième couche peut alors être imprimée. L'épaisseur entre les deux couches définit la résolution en z de l'impression (Juskova et al., 2018 ; Melchels et al., 2010). La longueur d'onde du laser est variable et définit le photoinitiateur utilisable présent dans le matériau. Le plus souvent les imprimantes utilisent des longueurs d'ondes UVs ou proche UVs (325 à 405 nm). Cette technologie est donc limitée à des matériaux photosensibles. Les matériaux utilisés sont généralement des résines ou hydrogels à base de polymères qui vont réticuler après exposition à la lumière en présence d'un photoinitiateur. La réaction de polymérisation est radicalaire : l'énergie lumineuse est absorbée par le photoinitiateur ce qui déclenche la formation de radicaux qui vont réagir avec les chaînes libres de polymère, entraînant la formation de liaisons covalentes permettant de créer un réseau réticulé. Cette réaction permet la polymérisation ou la réticulation d'hydrogel à partir de divers polymères naturels ou synthétiques de façon simple et rapide. Cette réaction de polymérisation permet également de contrôler précisément la réticulation spatiale de l'hydrogel (Annabi et al., 2014 ; Pereira and Bártolo, 2015). Cependant ce type de réaction en chaîne présente plusieurs inconvénients : la réaction de polymérisation radicalaire produit des radicaux libres qui présentent une cytotoxicité à haute concentration (Sabnis et al., 2009), les réactions sont inhibées par l'oxygène, la cinétique de réticulation est difficile à contrôler et les réactions aléatoires entre les chaînes de polymère peuvent générer

des hydrogels hétérogènes (Pereira and Bártolo, 2015). L'impression DLP (Digital Light Processing) est une technologie de fabrication additive par photopolymérisation utilisant un procédé de projection d'images. Les deux techniques sont similaires, toutefois, la technologie DLP est considérée comme un procédé d'écriture parallèle où l'image de chaque couche est projetée en une étape sur l'ensemble de la zone d'écriture. Le principal avantage de l'approche DLP est sa rapidité d'impression (Mandrycky et al., 2016; Pereira and Bártolo, 2015). Cependant, contrairement à l'écriture laser, la résolution d'impression en X,Y (jusqu'à 25 μm) dépend de la surface totale d'exposition.

La SLA est une technique qui offre la possibilité d'imprimer des géométries complexes avec une haute résolution (inférieure à 50 μm). Cette technologie a déjà été utilisée pour l'impression de scaffolds de culture cellulaire mais aussi pour la bioimpression (Melchels et al., 2010) (**Figure 31**). La stéréolithographie a été utilisée pour mettre en forme un hydrogel de gélatine méthacrylate (Gel-MA) en couche de motifs hexagonaux, ces couches ont été superposées afin de créer une structure 3D complexe. La colonisation cellulaire a été testée, et il a été montré que ces scaffolds 3D supportent la croissance, la prolifération et la migration des cellules endothéliales HUVECs. L'expression des marqueurs spécifiques endothéliaux CD31 et Von Willebrand Factor a également été observée (**Figure 31 B**) (Gauvin et al., 2012). De façon similaire, un scaffold poreux souple et élastique à base de résine méthacrylée a été généré par SLA pour l'ingénierie tissulaire cartilagineuse. Ces scaffolds supportent l'adhésion de chondrocytes bovins ainsi que leur prolifération et la sécrétion de glycosaminoglycanes et de fibrilles de collagène jusqu'à 6 semaines de cultures, ce qui aboutit à une augmentation de la rigidité du scaffold au cours du temps (Schuller-Ravoo et al., 2013). La SLA a également été utilisée pour de la bioimpression, et la génération de co-culture en 3D de cellules encapsulées dans un hydrogel à base de PEG-DA (poly-éthylène glycol diacrylate). Des couches contenant des cellules NIH 3T3 ont été imprimées successivement et la présence de cellules vivantes a été observée jusqu'à 14 jours après impression, malgré un faible taux de viabilité (Chan et al., 2010) (**Figure 31 C**).

La stéréolithographie est actuellement la technique d'impression 3D qui offre un des meilleur compromis résolution/volume d'impression, en faisant donc une technique de choix pour l'impression de matériaux inertes afin de générer des scaffolds complexes. Les technologies de lithographie laser par 2 photons (Accardo et al., 2017) offrent des résolutions d'impression bien supérieures avec des tailles de voxel de 200 x 400 nm (x,y,z) mais leur

lenteur et leur faible volume d'impression (quelques mm³ au maximum) sont des limites considérables pour des applications dans l'ingénierie tissulaire.

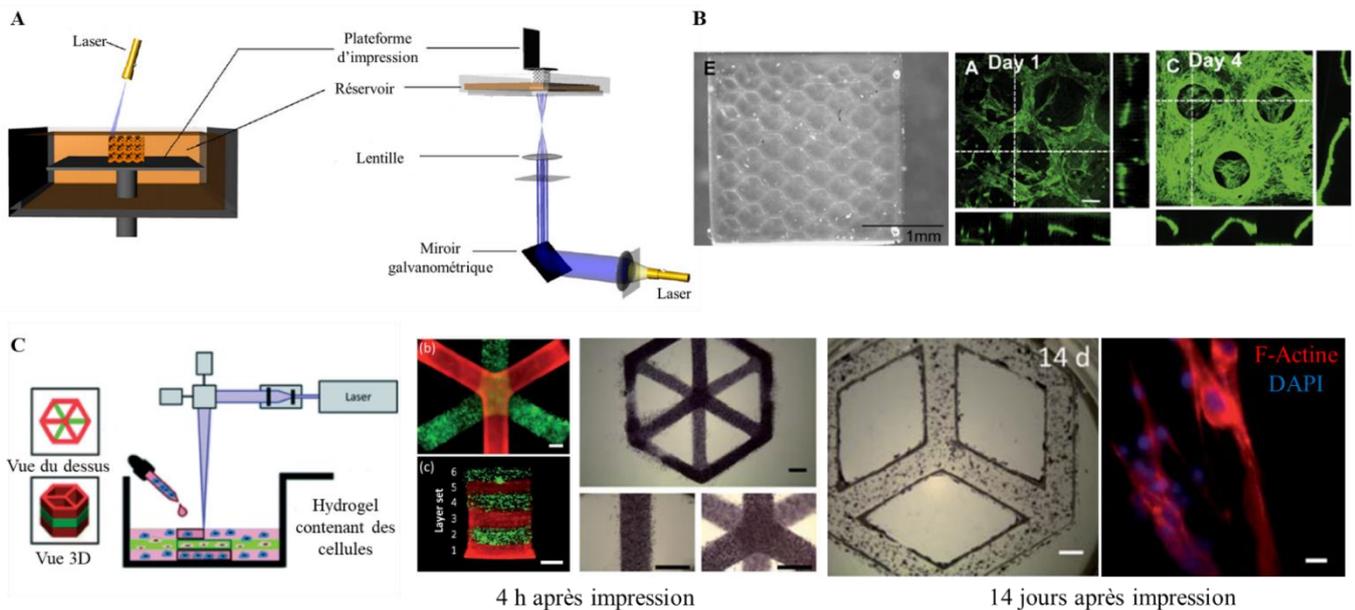


Figure 31 : La stéréolithographie en ingénierie tissulaire

La stéréolithographie est une méthode de fabrication additive permettant l'impression d'un objet couche par couche grâce à la photopolymérisation d'un matériau par un laser (Melchels et al., 2010) (A). La SLA est utilisée pour la génération de scaffold permettant la culture cellulaire (B), un scaffold constitué de couches poreuses de Gel-MA empilées a été utilisée pour la culture de cellules HUVECs-GFP après 4 jours de culture, le scaffold est entièrement recouvert de cellules (Gauvin et al., 2012). La SLA permet également l'encapsulation de cellules (C). Une structure multimatériaux contenant des cellules a été imprimée. Juste après l'impression un test MTT a permis de vérifier l'homogénéité et la viabilité cellulaire, les cultures ont été maintenues jusqu'à 14 jours et des cellules vivantes et étalées ont été observées (Chan V. et al., 2010).

Il est important de noter, dans les deux cas de figures, que l'utilisation de laser ou lampes UVs restreint l'utilisation de ces techniques pour la bioimpression (Melchels et al., 2010; Moroni et al., 2018). En effet, l'exposition au UVs peut entraîner des dommages à l'ADN, la puissance des lampes UVs est donc généralement limitée à 5-10mW/cm². Il a été montré sur des cellules musculaires aortiques humaines, que l'exposition aux UVs d'une longueur d'onde de 365 nm et une puissance de 10 mW/cm² jusqu'à 5 min n'affecte pas la viabilité cellulaire, cependant la présence de dommages à l'ADN n'a pas été vérifiée (Sabnis et al., 2009). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, la libération de radicaux libres lors de la réaction de polymérisation peut être cytotoxique. La SLA permet d'atteindre une viabilité cellulaire allant de 40 à 80 % en fonction de la longueur d'onde, de la puissance de la lampe, et du photoinitiateur utilisé (Cui et al., 2017). Les photoinitiateurs Irgacure 819 et Irgacure 2959 sont faiblement cytotoxiques à faible concentration (< 0,5 % m/v) (Arcaute et al., 2006; Urrios et al., 2016), alors que l'Irgacure 651 est fortement cytotoxique à une concentration de 0,2 % (Mironi-Harpaz et al., 2012). Cependant ces résultats sont controversés puisqu'il a été montré

que l'Irgacure 2959 était cytotoxique à des doses beaucoup plus faibles (0,04 %). Cet effet est dû à la libération de radicaux libres et est abolit en présence d'agents antioxydants (Sabnis et al., 2009). Enfin, la puissance et le temps d'exposition au laser vont déterminer l'énergie absorbée par le matériau ($\text{Energie (Joule/cm}^2\text{)} = \text{Puissance (Watt)} \times \text{temps (secondes)}$), il y a donc un équilibre à déterminer entre le temps d'impression et la puissance de la lampe utilisée. Par exemple, un système avec une lampe à 365 nm d'une puissance de 78mW/cm², peut réticuler un gel de PEG-dma (diméthacrylate) + 0,5 % Irgacure 2959 en 5 sec, encapsulant des fibroblastes avec une viabilité de 90 % (Arcaute et al., 2006). Ce taux de survie est équivalent, voire supérieur, à d'autres observations réalisées avec des puissances plus faibles (2-10 mW/cm²) et peut s'expliquer par la diminution du temps d'exposition des cellules aux UVs et donc de l'énergie absorbée (350 mJ/cm² versus 1200 mJ/cm²) (Arcaute et al., 2006).

En complément à ces techniques d'impression 3D par la lumière, les trois techniques de bioimpression principales sont l'impression par jet d'encre, l'extrusion et les imprimantes assistées par laser (**Figure 32**) (Murphy and Atala, 2014 ; Pati et al., 2016).

- Les imprimantes à jet d'encre fonctionnent grâce à une tête d'impression qui éjecte des gouttes de liquide sur une surface via un procédé thermique ou piézoélectrique. Les approches thermiques fonctionnent grâce à une tête d'impression qui produit des augmentations de température très rapide (de l'ordre de 2 μ s), ce qui génère une bulle de vapeur dont l'expansion permet d'expulser des gouttelettes au travers d'une aiguille d'un diamètre de 30 à 200 μ m. La chaleur dissipée au niveau de la tête engendre des augmentations localisées de température qui atteignent entre 200 et 300 °C, ce qui ne semble pas impacter l'intégrité du matériel biologique ou des cellules imprimées (Murphy and Atala, 2014). Les approches basées sur un cristal piézo-électrique permettent de créer une onde acoustique dans la tête d'impression pour fractionner le liquide en gouttelettes à intervalle régulier. L'avantage de ces imprimantes est la possibilité de contrôler la taille des gouttelettes et leur éjection, ainsi que d'éviter l'exposition des cellules à la chaleur (Murphy and Atala, 2014) (**Figure 32 A**). Les imprimantes par jet d'encre permettent d'imprimer des cellules selon des motifs prédéfinis, les matériaux utilisés peuvent être thermo ou photosensibles pour être polymériser après leur impression. Le principal inconvénient de cette technique est la faible densité cellulaire nécessaire afin d'empêcher l'obstruction des têtes d'impression ($< 1.10^6$ cellules/ml) (Mandrycky et al., 2016) et la nécessité de contrôler la viscosité et les propriétés rhéologiques des matériaux pour garantir leur extrusion et la stabilité des structures générées. Cette technique a été utilisée pour de multiples applications : l'impression de chondrocytes dans le but de régénérer du cartilage (Cui

et al., 2012), la reconstruction de vaisseaux sanguins par impression de cellules endothéliales humaines (Cui and Boland, 2009) ou encore l'impression de cellules souches multipotentes et de fibroblastes afin de régénérer de la peau (Saunders et al., 2008; Skardal et al., 2012). Toutes ces études montrent que l'impression par jet d'encre permet d'imprimer des structures 3D complexes avec une haute résolution (environ 10 μm) et une viabilité cellulaire importante (supérieure à 85%) (Li et al., 2016a ; Mandrycky et al., 2016).

- Les imprimantes à extrusion consistent en une seringue mobile en x, y et z qui permet d'extruder les biomatériaux grâce à l'application d'une pression pneumatique ou mécanique (piston et vis) à travers des buses de quelques centaines de micromètres de diamètre afin de créer des rubans continus de matériaux. Des systèmes comprenant plusieurs têtes d'impression ou seringues ont été développés, permettant de déposer simultanément plusieurs matériaux afin d'imprimer en une étape un scaffold et une suspension cellulaire (Li et al., 2016a; Murphy and Atala, 2014) (**Figure 32 B**). Les imprimantes à extrusion sont les imprimantes les plus utilisées en bioimpression, et sont compatibles avec de nombreux matériaux biologiques. L'inconvénient majeur de ces imprimantes est le stress mécanique généré au moment de l'impression causant dans certains cas une importante mort cellulaire (Mandrycky et al., 2016; Murphy and Atala, 2014). De nombreux paramètres peuvent influencer la qualité de l'impression et la survie cellulaire notamment le diamètre de l'aiguille, la pression exercée pour extruder le matériau et enfin les propriétés rhéologiques du matériau qui représentent l'une des composantes les plus importantes de cette technique (Chang et al., 2008). En effet, en addition aux propriétés biologiques permettant la prolifération et le développement cellulaire, le matériau doit à la fois présenter des propriétés rhéologiques (viscosité, plasticité et élasticité) appropriées pendant l'extrusion, et des propriétés de gélification permettant le dépôt couche après couche au cours de l'impression ainsi que la conservation de la forme tridimensionnelle au cours du processus post-impression. Cependant, augmenter la viscoélasticité et les propriétés de gélification, ce qui facilite l'impression, entraîne une augmentation des forces de cisaillement subit par les cellules et donc une augmentation de la mort cellulaire. Des propriétés rhéologiques optimales de la bioencre représentent donc l'un des facteurs les plus cruciaux à considérer pour la bioimpression par extrusion (Chang et al., 2008; Zhao et al., 2015). Les imprimantes par extrusion ont notamment été utilisées pour imprimer des fibroblastes primaires humains afin de reconstituer de la peau *in vitro* ou encore une oreille (Pouchet et al., 2017). De manière similaire une oreille « bionique » a été fabriquée à partir de chondrocytes imprimés dans le but de reconstituer le cartilage auriculaire (Mannoor et al., 2013). Enfin cette technologie permet l'impression multimatériaux, ce qui a été exploité

pour générer des structures hétérogènes formées de cellules endothéliales et de fibroblastes afin de mimer un réseau vasculaire (Kolesky et al., 2014).

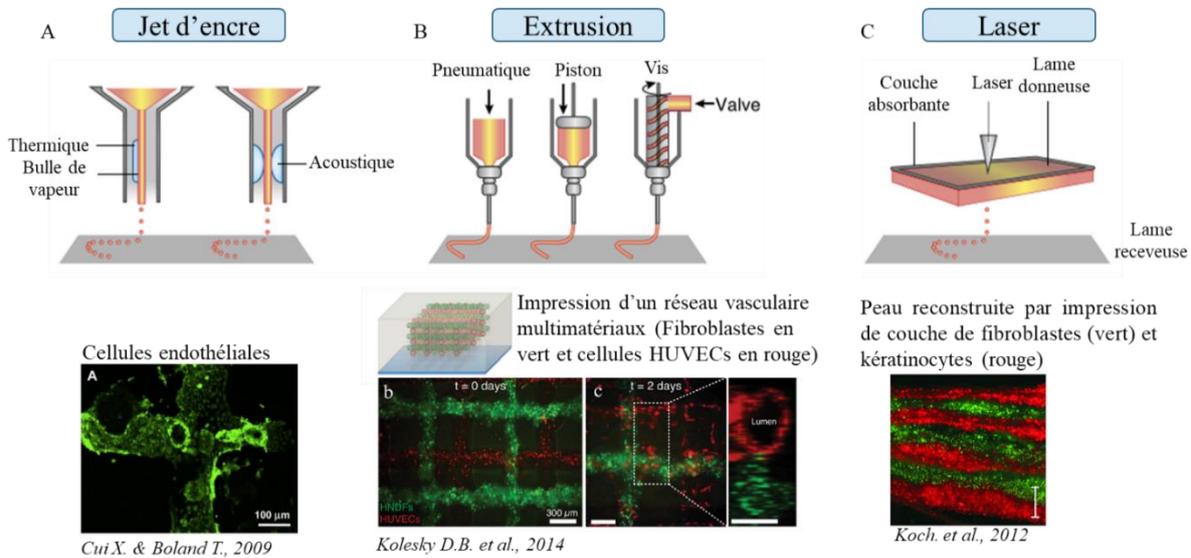


Figure 32 : Les trois approches majeures de bioimpression

Les trois principales technologies de bioimpression sont l'impression par jet d'encre (A) l'extrusion (B) et l'impression assistée par laser (C), ces techniques ont permis d'imprimer de nombreux types cellulaires afin de générer des structures variées. Murphy & Atala, 2014

- Les imprimantes assistées par laser utilisent un laser pulsé comme source d'énergie pour déposer le biomatériau sur un substrat. Ce procédé LIFT (Laser Induced Forward Transfer) repose sur trois composants : un laser pulsé d'une longueur d'onde pouvant se situer dans l'infrarouge ou dans l'UV, une lame donneuse qui consiste généralement en une lamelle de verre recouverte d'une couche absorbante d'énergie en métal (or, titane ou argent) et de la couche de biomatériau, et enfin d'une lame receveuse située en face de la couche donneuse. Le laser irradie la lame donneuse, la couche absorbante permet de convertir l'énergie lumineuse en énergie thermique, propulsant des gouttes de matériel biologique sur la lame receveuse (Li et al., 2016a ; Murphy and Atala, 2014) (Figure 32 C). Cette technologie permet l'impression de matériaux multiples avec une haute résolution (de l'ordre de la dizaine de μm ou de la cellule unique) et une très forte viabilité cellulaire (95 %), néanmoins son coût très élevé limite son utilisation dans la recherche en ingénierie tissulaire (Mandrycky et al., 2016). L'impression par laser a été utilisée pour imprimer de la peau en imprimant successivement des couches de matrice, fibroblastes puis kératinocytes *in vitro* (Koch et al., 2012) et *in vivo* (Michael et al., 2013). De manière similaire des cellules souches mésenchymateuses ont été

imprimées sur le crâne d'animaux après lésions afin de stimuler la régénération osseuse (Keriquel et al., 2017).

Technique	Résolution	Avantages	Inconvénients
Moulage	100 nm	Possibilité de réutiliser le moule Facile et rapide d'utilisation Peu coûteux	Limité à des scaffolds continus et homogène (matériau unique) La fabrication du moule nécessite de nombreuses étapes
Stéréolithographie	3 µm	Flexibilité dans la géométrie Possibilité d'imprimer des complexes Faible coût	Faible viabilité cellulaire (40%) Limitée à des matériaux photosensibles, les photoinitiateurs peuvent être cytotoxiques
Jet d'encre	10 µm	Viabilité cellulaire > 90 % Faible coût Rapide	Faible densité cellulaire Peu de matériaux compatibles Stress mécanique et thermique Difficulté à réaliser des structures 3D complexes
Extrusion	100 µm	Forte densité cellulaire Multimatériaux	Stress mécanique : viabilité cellulaire (40-80%) Impression lente
Impression assistée par laser	20 µm	Viabilité cellulaire > 95 % Impression rapide	Coût élevé Difficulté à réaliser des structures 3D complexes

Table 6 : Avantages et inconvénients des techniques de microstructuration

En résumé, plusieurs approches sont envisageables afin d'introduire une microstructuration des modèles de culture actuellement disponibles permettant de guider l'organisation cellulaire. Le choix de la technologie dépend ensuite des applications souhaitées (**Table 6**). L'impression 3D est une technologie prometteuse pour le prototypage et la production de support de culture. Elle permet la fabrication de modèles 3D complexes de façon reproductible et automatique afin de créer des modèles *in vitro* plus fidèles et physiologiques avec de nombreuses applications possibles, notamment dans les domaines de l'ingénierie tissulaire, de la médecine régénérative, ou encore pour les tests de cytotoxicité et d'efficacité de molécules thérapeutiques. Ce type d'approche pourrait notamment contribuer à diminuer ou remplacer l'utilisation des modèles animaux pour ces dernières applications.

3. Apport de la microfluidique : le développement des organes sur puces

L'intérêt pour le développement de modèles de culture plus physiologiques, standardisés et mimant à la fois les propriétés physiques et biochimiques naturelles, a mené à l'utilisation de systèmes microfluidiques pour la culture cellulaire. La microfluidique est définie comme « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides (10^{-8} à 10^{-9} L), en utilisant des canaux de quelques dizaines de micromètres de diamètre » (Whitesides, 2006). Du fait de ces volumes réduits, le flux dans les systèmes microfluidiques est entièrement laminaire et aucun mélange par convection ne se produit entre 2 flux qui s'écoulent côte à côte

avec le même canal de sortie, ce qui permet la génération précise de gradients uniquement par des processus de diffusions. Les systèmes les plus simples consistent en une seule chambre microfluidique perfusée et contenant un seul type cellulaire (Huh et al., 2011).

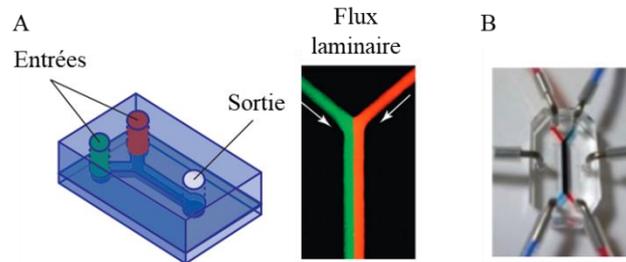


Figure 33 : Puce microfluidique

Exemple de puces microfluidiques fabriquées en PDMS, un élastomère transparent, biocompatible et perméable à l'oxygène. (A) deux fluides (rouge et vert) injectés à deux entrées indépendantes se rejoignent dans une jonction en Y et entrent dans un canal droit où ils s'écoulent selon des flux laminaires adjacents sans mélange (Huh et al, 2011). (B) photographie d'une puce microfluidique à deux chambres de cultures, avec des colorants rouge et bleu perfusés par les canaux supérieur et inférieur (Bathia S.N. & Ingberg D.E., 2014).

Ce type de biopuces a permis dans un premier temps d'étudier l'impact de gradients biochimiques linéaires sur le chimiotactisme des neutrophiles en réponse à l'IL8 (Li Jeon et al., 2002), la différenciation de cellules souches neuronales en présence d'un gradient de facteurs de croissance (Chung et al., 2005) ou encore le guidage axonal des neurones rétiniens en réponse à un gradient d'éphrines (Lang et al., 2008).

Depuis, des systèmes beaucoup plus sophistiqués ont été développés, composés de plusieurs canaux interconnectés par des membranes poreuses, et comprenant plusieurs types cellulaires afin de recréer l'interface entre les différents compartiments tissulaires. Ces systèmes peuvent également intégrer des forces physiques, telles que forces de compression, le stress généré par le flux ou encore des forces cycliques (extension/contraction). Cette technologie permet donc de développer des systèmes *in vitro* plus complexes, nommés les organes-sur-puce (Zhang et al., 2018). Le terme « Organ-on-Chip » a été inventé par Donald Ingber en 2010 et il définit les organes sur puce comme « des dispositifs microfluidiques pour la culture de cellules vivantes dans des canaux perfusés en continu afin de modéliser les fonctions physiologiques des tissus et organes » (Bhatia and Ingber, 2014).

Le premier organe sur puce développé est un système récapitulant les interfaces alvéoles-capillaires et le mouvement de respiration des poumons (Huh et al., 2010). Le système est formé de deux chambres séparées par une fine membrane (10 μm) de PDMS flexible et poreuse. Du Matrigel est déposé sur la membrane, des cellules humaines épithéliales

alvéolaires sont cultivées au niveau du compartiment supérieur et des cellules endothéliales pulmonaires humaines sontensemencées de l'autre côté de la membrane au niveau du compartiment inférieur. Une fois que les cellules ont atteint la confluence, de l'air est introduit dans le compartiment épithélial afin de recréer l'interface air-liquide. Les forces mécaniques générées par la respiration ont été mimées grâce à deux chambres placées sur les côtés du dispositif, une mise en dépression de ces chambres permet l'étirement de la membrane et donc des cellules, une augmentation de pression permet un retour à l'état basal (**Figure 34**). Ces conditions de culture favorisent la croissance des cellules pendant plusieurs semaines, permettent une augmentation de la production de surfactants et récapitulent la perméabilité et l'intégrité de la barrière pulmonaire observées *in vivo*. Ce système a été utilisé pour investiguer les mécanismes de réponses à des agents infectieux et pathogènes, ainsi que la réponse à l'exposition aux nanoparticules ([Huh et al., 2010](#)).

A l'heure actuelle, de nombreux organes ont été modélisés sur puce microfluidique avec différents niveaux de complexité. Un système d'intestin sur puce a été développé permettant de reproduire les composantes mécaniques tels que le péristaltisme ou le stress généré par le flux, en adaptant le modèle précédemment développé pour le poumons (détaillé p.106) ([Kim et al., 2012a](#)). De nombreux microsystèmes permettant de récapituler certains aspects structuraux, fonctionnels, biochimiques et mécaniques ont également été développés pour mimer le foie ([Nakao et al., 2011](#)), le rein ([Jang et al., 2013](#)), le cerveau ([Park et al., 2015](#)), la peau ([Abaci et al., 2015](#)), et la barrière hémato-encéphalique ([Griep et al., 2013](#)). Ces systèmes peuvent également être connectés via un réseau microfluidique afin de recréer les interactions inter-organes (**figure 34**).

Ces technologies d'organes-sur-puces peuvent également bénéficier des techniques d'impression 3D afin de créer des systèmes plus complexes d'organes sur puces formés de plusieurs matériaux imprimés simultanément en trois dimensions. Un modèle de cœur-sur-puce a été fabriqué entièrement par impression 3D. Ce système contient un senseur mécanique déformable en polyuréthane sur lequel repose une couche en PDMS rainuré pour l'ensemencement de cardiomyocytes, ce motif strié du PDMS permet l'assemblage et le guidage des cellules pour former un tissu anisotropique. La contraction des cardiomyocytes se produit de façon synchrone ce qui entraîne la déformation du senseur et permet donc de détecter et mesurer la contraction cellulaire. Une composante électrique a également été intégrée pour mesurer la résistance cellulaire. Enfin, un puit en PDMS est imprimé autour des puces afin de les isoler et de multiplexer le système (**Figure 34**). Pour créer ce système, 6 encres ont été

utilisées et imprimées successivement grâce à une imprimante par extrusion multimatériaux. Cette puce est l'un des premiers modèles d'organes sur puce entièrement généré par impression 3D. Une preuve de concept a été réalisée sur ce système cardiaque microphysiologique via le test de drogues influençant la force de contraction ou le rythme cardiaque, tels que des agonistes β -adrénergique (Lind et al., 2017).

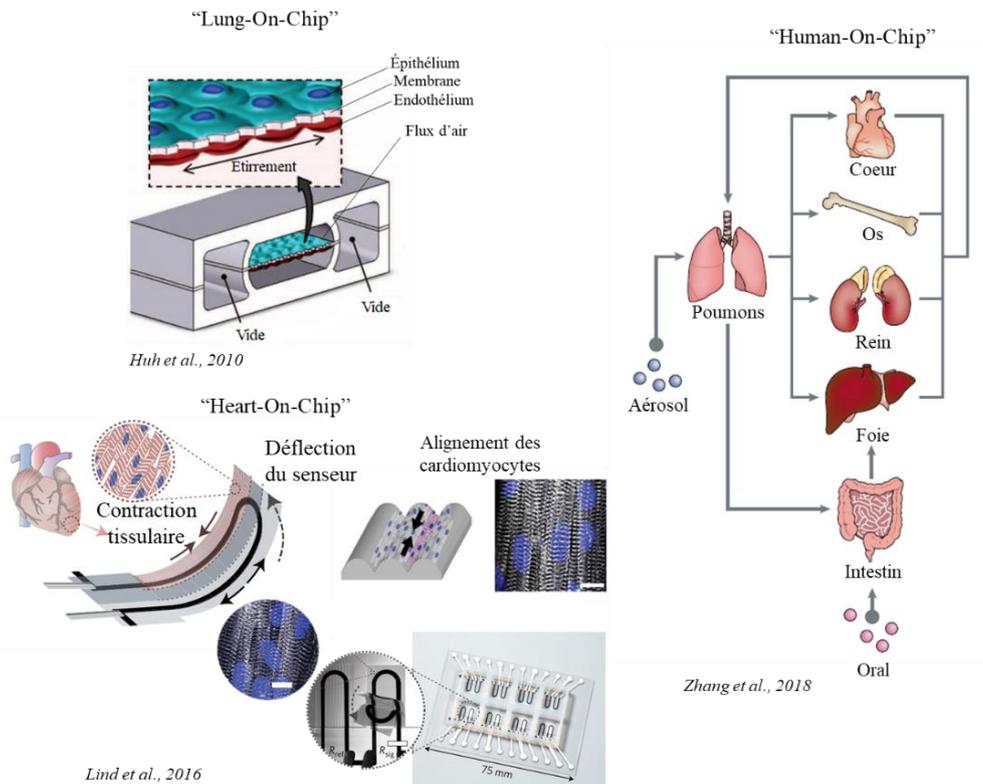


Figure 34 : Les organes sur puce

Le premier « Organ-On-Chip » développé est le « Lung-On-Chip » qui permet de mimer la barrière pulmonaire grâce à la microfluidique. Depuis les technologies d'impression 3D ont été intégrées et ont permis de fabriquer des systèmes complexes de façon automatisée, exemple du « Heart-On-Chip ». Ces puces microfluidiques représentant un seul organe peuvent être combinées afin de créer un « Human-On-Chip » pour étudier notamment l'absorption de molécule à l'échelle multi-organes.

Ces organes-sur-puces représentent donc un outil puissant pour l'étude des mécanismes biologiques ou biophysiques, mais également pour les tests de cytotoxicité dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Récemment, un nouveau concept émerge pour décrire ces modèles *in vitro*, les systèmes microphysiologiques. Ce terme, plutôt que le terme « Organ-On-Chip » désigne des modèles *in vitro* récapitulant certains aspects de la fonction d'organes *in vivo*, et non de l'organe entier, grâce à l'utilisation de microenvironnements de culture spécialisés, notamment des matrices 3D et une microperfusion (Edington et al., 2018).

III. Matériaux mimant la matrice extracellulaire

Une composante clé de ces nouveaux modèles de culture est le choix du biomatériau utilisé pour la génération des scaffolds. Le rôle de ce matériau est de reproduire de manière artificielle les sites d'adhésion et les propriétés biochimiques, mécaniques et de porosité de la matrice extracellulaire. Certains polymères thermoplastiques, photosensibles ou thermosensibles ont été utilisés dans la littérature comme support de culture (Brown et al., 2005 ; Huh et al., 2011). C'est le cas notamment du PDMS dont les propriétés de porosité au gaz, de biocompatibilité et de déformation élastique ont pu être mise à profit pour étudier l'impact d'une déformation cyclique sur l'homéostasie et la fonction tissulaire (Huh et al., 2010). Toutefois, les difficultés de contrôle de la rigidité et la non porosité aux espèces en solutions limitent fortement l'utilisation de ce matériau. C'est pourquoi, dans la plupart des applications, les scaffolds de biomatériaux sont généralement formés d'hydrogels qui reproduisent plus fidèlement les propriétés physico-chimiques de la matrice extracellulaire.

Les gels sont des matériaux semi-solides biphasiques formés d'un réseau de polymères dilués dans un liquide, lorsque la phase liquide est aqueuse on parle alors d'hydrogels. Les hydrogels sont formés d'un réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles qui interagissent via des liaisons chimiques ou physiques, ce qui leur permet d'absorber de grandes quantités d'eau ou de liquide biologique et de gonfler, tout en conservant leur structure tridimensionnelle sans se dissoudre (El-Sherbiny and Yacoub, 2013 ; Zhu and Marchant, 2011). L'intégrité de la structure dépend du degré de réticulation entre les chaînes de polymères et du mécanisme de polymérisation, ce qui permet de différencier les hydrogels en deux classes : chimiques ou physiques. Les liaisons physiques comprennent les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes, les interactions ioniques ou encore des enchevêtrements entre les chaînes de polymères. Ces liaisons sont non permanentes, mais suffisantes pour maintenir la structure de l'hydrogel dans l'eau. En opposition, les liaisons chimiques, sont permanentes et formées par des liaisons covalentes. Un moyen simple de créer ces liaisons covalentes est de fonctionnaliser les chaînes de polymères afin de créer des groupements réactifs, la réticulation peut alors se faire par polymérisation radicalaire, réaction chimique ou grâce à la présence d'enzymes. (Ruedinger et al., 2015 ; Zhu and Marchant, 2011). Les hydrogels sont des gels poreux et la porosité du réseau (taille des pores ou maille) doit être suffisante pour assurer l'apport en oxygène et en nutriments. La taille des pores du réseau dépend du degré de réticulation de l'hydrogel, de la structure chimique du polymère et notamment de la longueur des chaînes ainsi

que des facteurs environnementaux tel que le pH, la température ou la force ionique (Peppas et al., 2000; Verhulsel et al., 2014).

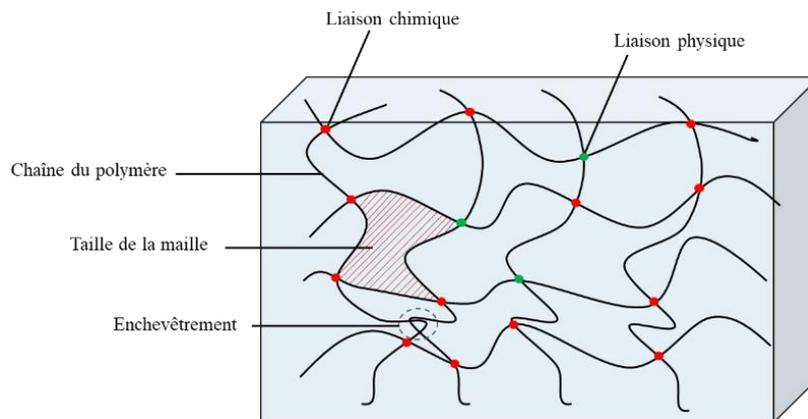


Figure 35 : Structure d'un hydrogel

Un hydrogel est un réseau de polymères hydrophiles réticulés chimiquement ou physiquement et capable d'absorber de grande quantité d'eau tout en maintenant sa structure tridimensionnelle.

Les hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire peuvent également être classés en deux catégories selon l'origine des polymères : les matériaux d'origine naturelle ou synthétique.

1. Matériaux d'origine naturelle

Les matériaux naturels sont des protéines ou polysaccharides purifiés à partir d'une source biologique animale ou végétale. Parmi les protéines couramment utilisées on retrouve notamment le collagène, l'albumine, la fibrine, le Matrigel et les protéines de la soie ; les polysaccharides comprennent l'acide hyaluronique, le chitosan ou l'agarose (Ruedinger et al., 2015; Verhulsel et al., 2014). Ces polymères naturels restent les plus physiologiques pour mimer la matrice puisqu'ils sont retrouvés dans les matrices extracellulaires *in vivo* et sont très efficaces pour soutenir l'adhésion, la croissance et la différenciation cellulaire (Peppas et al., 2006). Les gels de polymères naturels peuvent être réticulés selon plusieurs mécanismes. Par exemple, des gels de collagène peuvent être obtenus sans aucune modification chimique, les chaînes peuvent s'auto-assembler pour former des fibres stables via la formation liaisons hydrogènes, cependant les gels obtenus présentent des propriétés mécaniques très faibles (Drury and Mooney, 2003). Afin d'augmenter la rigidité, il est possible de former des scaffolds de collagène via l'ajout d'agents réticulants, tels que le glutaraldéhyde, l'exposition à des agents physiques (UVs, température), en le mélangeant avec d'autres polymères (Lee et al., 2001), ou encore via la conjugaison de groupements réactifs de type acrylate afin de le rendre photosensible, ce qui permet une réticulation par réaction radicalaire en présence d'un photoinitiateur (Drzewiecki et al., 2017). De manière similaire, la gélatine méthacrylate est couramment utilisée en ingénierie tissulaire. La gélatine est un dérivé du collagène obtenu par

hydrolyse de la triple hélice de collagène en molécules simple brin. La gélatine est moins immunogénique que le collagène et conserve les séquences RGD (Arg-Gly-Asp) qui favorisent l'adhésion cellulaire (Yue et al., 2015). La gélatine contient de nombreux groupements amines (-NH₂) qui réagissent avec l'anhydride méthacrylique, entraînant la substitution des groupements amines par des groupements méthacrylates, permettant ensuite la photoréticulation par réaction des groupement acryloyles entre eux (Nichol et al., 2010). Le degré de substitution des groupements amines est variable mais reste faible, laissant ainsi la majorité des motifs RGD intacts et n'affectant donc pas les propriétés d'adhésion de la gélatine (Yue et al., 2015).

Les matériaux naturels sont dégradables par les métalloprotéases cellulaires ce qui est un atout pour les scaffolds destinés à l'implantation, mais un inconvénient pour le développement de modèles *in vitro*, puisque la topographie 3D n'est pas conservée lors de cultures de longues durées (Blondel and Lutolf, 2019; Yu et al., 2012). Les hydrogels naturels possèdent également des propriétés mécaniques et biochimiques souvent faiblement caractérisées et donc difficilement modifiables ou contrôlables. De plus, du fait de leur origine naturelle, leur composition peut varier d'un lot à l'autre, nuisant à la reproductibilité des expériences (Ruedinger et al., 2015).

Une alternative intéressante permettant de limiter ces inconvénients est l'utilisation d'hydrogels à base de polymères synthétiques.

2. Matériaux synthétiques

Les hydrogels synthétiques peuvent être générés à partir de nombreux polymères tel que le polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene oxide (PEO), polyhydroxymethyl methacrylate (PHEMA), polyacryl amide ou le polyethylene glycol (PEG). Les hydrogels à base de PEG font partis des matériaux les plus utilisés pour des applications biomédicales, ils sont biocompatibles, non immunogènes, et inertes vis-à-vis de de la plupart des molécules biologiques et notamment des protéines, et le PEG est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) (Peppas et al., 2006; Zhu, 2010). Le PEG a une structure linéaire ou branchée (multibras), la structure basique est un PEGdiol, se terminant par des groupements hydroxyyles (-OH). Ces groupements hydroxyyles peuvent être convertis en de nombreux groupes fonctionnels tel que des groupements thiols (-SH), amine (-NH₂), acide carboxylique (-COOH) ou encore acrylate (-CH₂=COOH). Ces groupes terminaux peuvent être identiques (PEG symétrique) ou différents (PEG asymétrique) et servent pour la formation des hydrogels ou la

conjugaison de biomolécules. Les polymères de PEG peuvent être réticulés par de nombreux mécanismes, l'approche la plus couramment utilisée pour créer des hydrogels de PEG est la photopolymérisation via l'utilisation de PEG acrylates comme le PEG-DA, le PEG diméthylacrylate et les PEG multibras acrylate (n-PEG-Acr) (Zhu, 2010), par un mécanisme de réaction radicalaire. La réaction est initiée par un photoinitiateur qui absorbe fortement l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée, ce qui entraîne son clivage et la libération de radicaux. Les espèces radicalaires réagissent avec les groupements acrylates sur la carbone vinyloxy et causent l'ouverture des doubles liaisons, le radical est alors porté par la chaîne de PEG modifiées menant à la formation de liaisons covalentes entre deux groupements acrylates sans double liaison. La réticulation se propage ensuite par addition successive de monomères sur la chaîne en croissance porteuse du radical (**Figure 36**) (Nguyen and West, 2002; Yang et al., 2015; Zhu et al., 2013). Les radicaux libres étant très réactifs, la réaction de polymérisation est très rapide. Les hydrogels synthétiques offrent également plus de flexibilité en terme de propriétés chimiques et physiques, par exemple en faisant varier la masse molaire du polymère, la quantité de photoinitiateur, ou encore le pourcentage de polymères présent dans la solution (Verhulsel et al., 2014).

Les hydrogels à base de PEG sont donc des matériaux de choix pour la création de scaffolds, cependant le PEG est complètement inerte et ses propriétés non adhésives font que les cellules n'adhèrent que très faiblement sur ce matériau. Il est donc nécessaire de combiner à ce matériau des molécules d'adhésion, telles que le collagène, la fibronectine ou encore des peptides RGD, afin de créer des matériaux hybrides semi-synthétiques contenant des polymères synthétiques conjugués avec des molécules biologiques (Guarnieri et al., 2010; Ruedinger et al., 2015).

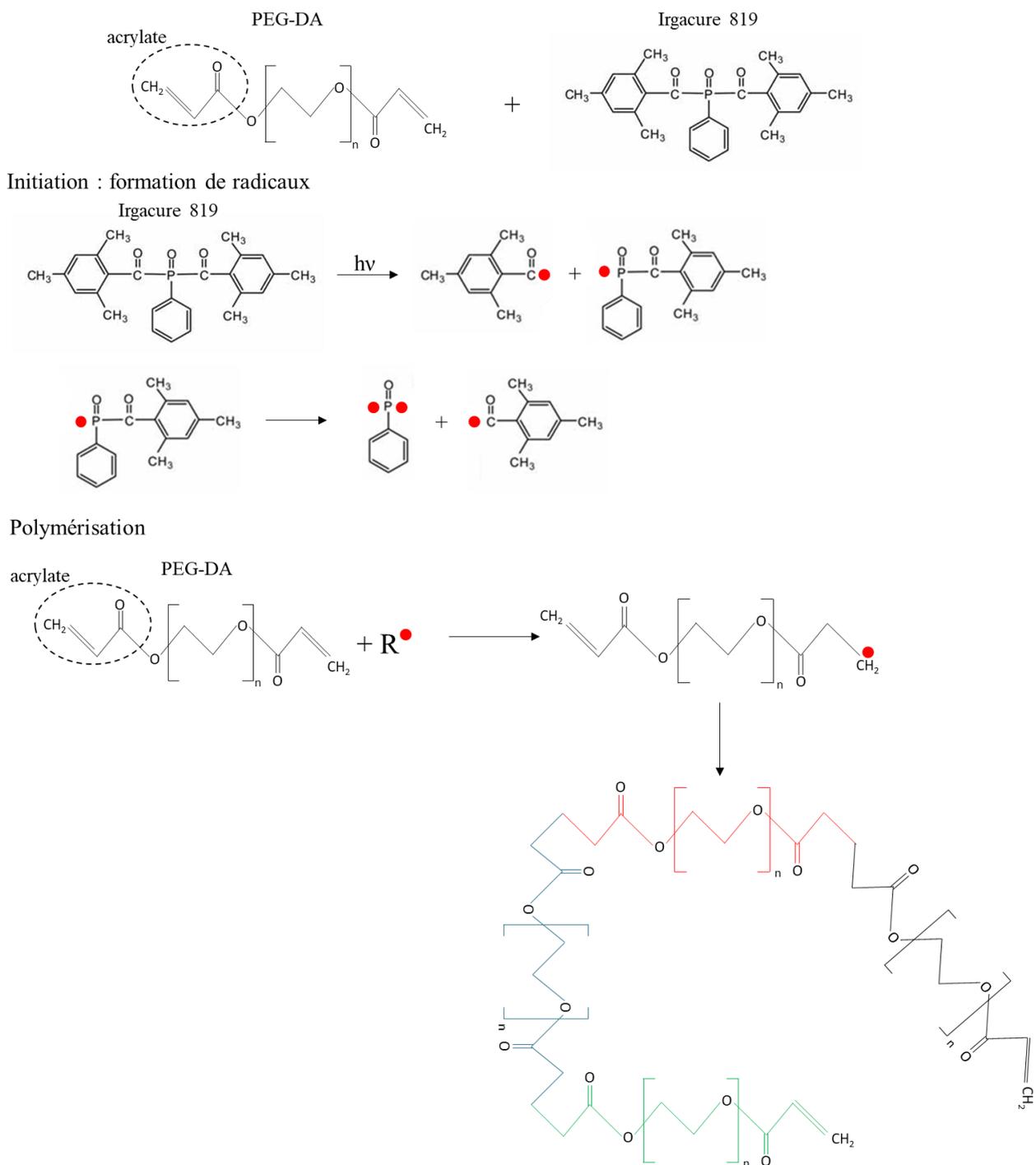


Figure 36 : Réaction de photopolymérisation du PEG-DA en présence d'Irgacure 819

La réticulation du PEG-DA pour former un hydrogel se produit via une réaction radicalaire. La réaction est initiée grâce au photoinitiateur, ici l'Irgacure 819, qui après absorption de photons est clivé ce qui entraîne la formation de radicaux. Le clivage de l'Irgacure 819 peut former jusqu'à 4 espèces radicalaires. Ces radicaux réagissent avec les groupements acrylates du PEG-DA, ce qui entraîne la liaison des chaînes de PEG via leurs groupements acrylates terminaux et aboutit à la formation d'un réseau tridimensionnel de PEG-DA et donc à la réticulation de l'hydrogel.

Les hydrogels de PEG peuvent être modifiés de différentes façons pour promouvoir l'adhésion cellulaire. Les peptides ou protéines peuvent être greffés à l'hydrogel après sa polymérisation, dans ce cas il est nécessaire de modifier la surface de l'hydrogel afin de fournir des sites de liaisons pour les peptides. Une méthode rapide consiste à co-polymériser le PEG-DA avec de l'acide acrylique ce qui fournit des groupements acides carboxyliques COO^- à pH neutre, qui chargent négativement le gel et permettent l'interaction avec des molécules chargées positivement via des interactions électrostatiques (Chen et al., 2015).

Ces groupements carboxyliques offrent également la possibilité de greffer de façon covalente des protéines sur l'hydrogel via l'ajout d'EDC (1-ethyl-3-(3-(diméthylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride) qui permet la formation d'une liaison amide entre une fonction carboxylique et une fonction amine dans l'eau. L'EDC réagit avec les groupements acides pour former un intermédiaire actif, l'O-acylisourée, qui est facilement déplacé par les groupements amines primaires présents dans le mélange réactionnel. L'amine primaire va alors former une liaison amide avec le groupement carboxylique d'origine et un sous-produit de l'EDC est libéré sous la forme d'un dérivé soluble de l'urée. L'intermédiaire O-acylisourée est peu stable dans les solutions aqueuses et l'absence de réaction avec une amine entraîne son hydrolyse et la régénération de l'acide carboxylique ainsi que la libération d'urée. Le N-hydroxysuccinimide (NHS) est souvent ajouté à la réaction pour améliorer l'efficacité et créer des intermédiaires stables. L'EDC couple le NHS aux carboxyles, formant un ester activé qui est plus stable que le O-acylisourée tout en permettant une conjugaison efficace aux amines primaires (Figure 37) (Bart et al., 2009 ; Kokkinis et al., 2013; Lee et al., 2007).

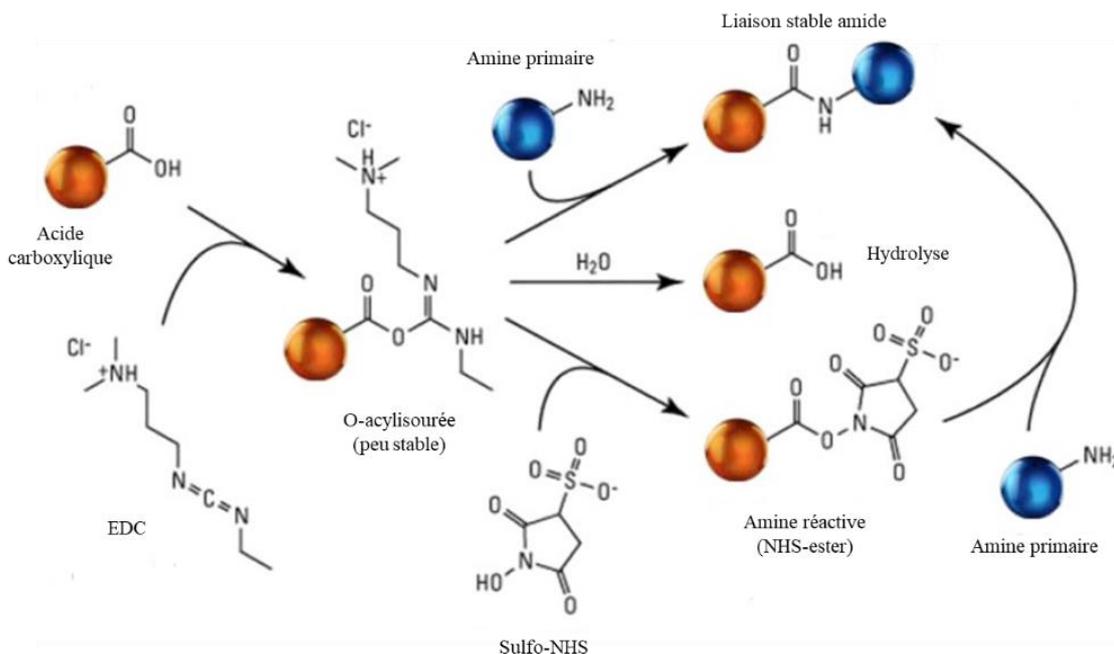


Figure 37 : Réaction de couplage EDC/NHS

L'EDC permet la conversion des acides carboxyliques en un intermédiaire O-acylisourée qui peut réagir avec les groupements amines pour former une liaison amide stable. L'ajout de NHS à cette réaction permet d'augmenter l'efficacité de la conjugaison. Kokkinis et al., 2013

Les molécules d'adhésion peuvent également être incorporées dans le mélange avant polymérisation et être soit piégées physiquement dans les mailles de l'hydrogel, soit liées chimiquement aux chaînes de polymères (Zhu, 2010). Une stratégie couramment utilisée pour la fabrication d'hydrogel de PEG bioactif est la copolymérisation de molécules acrylées avec des chaînes de PEG-DA. Les peptides-acrylates peuvent être générés via la fonctionnalisation du groupement amine N-terminal avec un acide acrylique portant un groupement ester activé NHS, créant une liaison amide stable entre le peptide et l'acide acrylique. De la même façon, les peptides peuvent être greffés directement sur les chaînes de PEG, grâce à l'utilisation de PEG-monoacrylate-NHS (PEG-Acr-NHS), qui porte un groupe acrylate à une extrémité et un groupe NHS à l'autre (Hern and Hubbell, 1998).

Cette technique a été utilisée afin de générer des peptide RGD monoacrylé et du PEG-RGD qui peuvent être co-polymérisés avec du PEG-DA, ce qui augmente l'adhésion et la migration cellulaire (Hern and Hubbell, 1998). Dans ce cas la distribution spatiale des groupements RGD est aléatoire et la quantité de peptide disponible est hétérogène. Afin de contrôler la quantité et l'organisation spatiale des peptides RGD dans les hydrogels, du PEG-DA-RGD a été synthétisé par conjugaison de RGD-DAP (acide diaminopropionique) au PEG-Acr-NHS, afin d'attacher le peptide RGD au milieu d'une chaîne de PEG-DA. Dans ce cas le PEG-RGD conserve les groupements acrylates aux deux extrémités. Cette approche permet d'incorporer une grande

quantité de peptides RGD de manière homogène sans affecter les propriétés mécaniques de l'hydrogel (Zhu et al., 2006; Zhu et al., 2009a). Des hydrogels de PEG-DA contenant du RGD linéaire ou cyclique ont ainsi été obtenus, et il a été montré que la présence de RGD cyclique augmente significativement l'adhésion cellulaire par rapport aux peptides RGD linéaires (Zhu et al., 2009a).

Ces techniques de modification des chaînes de PEG-DA ont été utilisées pour l'incorporation de différents sites d'adhésions, mais également de sites de dégradation reconnus par les métalloprotéases afin de rendre les hydrogels dégradables (Phelps et al., 2010), ou encore des facteurs de croissances tel que le VEGF (Phelps et al., 2010) ou l'EGF (Gobin and West, 2003) pour favoriser la colonisation des scaffolds, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire.

Bien que la photopolymérisation présente de nombreux avantages, l'utilisation d'UVs peut créer des dommages cellulaires. Une des alternatives pour la réticulation et la modification des hydrogels de PEG est l'addition de Michael, qui permet la création d'une liaison covalente entre un groupement nucléophile (amine ou thiol) et un groupement électrophile : acrylate, vinyle sulfone (VS) ou maléimide (Mal). Le mélange des polymères portant ces groupements est suffisante à la réaction et l'hydrogel peut se former dans des conditions physiologiques en contact avec des tissus, et affecte peu la viabilité cellulaire, en faisant donc une méthode de réticulation idéale pour l'encapsulation cellulaire (Hiemstra et al., 2007; Lutolf and Hubbell, 2003 ; Lutolf et al., 2003).

La flexibilité des hydrogels synthétiques est un des avantages majeurs de ces matériaux et permet de décomposer la complexité de la matrice extracellulaire afin d'étudier l'effet des facteurs biochimiques ou mécaniques de façon indépendante sur le comportement cellulaire.

Ce type de biomatériau a récemment été utilisé pour remplacer le Matrigel afin de générer des organoïdes et améliorer le contrôle des propriétés physiques et la reproductibilité des cultures (Blondel and Lutolf, 2019). Des organoïdes intestinaux ont été obtenus à partir de cellules souches intestinales adultes Lgr5⁺ (Gjorevski et al., 2016), d'iPSC, ou de cellules souches embryonnaires humaines (Cruz-Acuna et al., 2017) incluses dans des hydrogels à base de PEG multibras PEG-4MAL (Cruz-Acuna et al., 2017) ou PEG-8-Acr (Gjorevski et al., 2016). Les hydrogels de PEG-8 bras ont été polymérisés via l'action du facteur XIII de la coagulation en présence de calcium et fonctionnalisés avec différentes molécules d'adhésion et de dégradation. Les propriétés mécaniques de l'hydrogel ont également été modifiées

(Gjorevski et al., 2016). Ce travail a permis de mettre en évidence que la présence de 1 mM de peptide RGD dans une matrice de rigidité intermédiaire (1,3kPa) permettait l'expansion des cellules souches intestinales de manière optimale via l'activation de la voie de signalisation YAP, alors que la diminution de la rigidité et la présence de laminine $\alpha1\beta1\gamma1$ sont essentielles à la différenciation et à la formation des organoïdes (Gjorevski and Lutolf, 2017; Gjorevski et al., 2016). De manière similaire, une autre étude a rapporté l'utilisation d'hydrogels de PEG-4MAL polymérisés via une réaction d'addition de Michael et fonctionnalisés avec des sites d'adhésion, puis liés à des peptides dégradables par les métalloprotéases indispensables à la survie des organoïdes. La proportion de polymères et des groupements d'adhésion ont été modulés afin d'identifier les conditions optimales pour l'expansion des cellules souches de manière similaire au Matrigel. Ces conditions sont 4% PEG-4MAL (module élastique d'environ 100 Pa) en présence de 2 mM de RGD et de peptides dégradables (Cruz-Acuna et al., 2017 ; Cruz-Acuna et al., 2018).

Ces études ont donc confirmé l'intérêt de l'utilisation de matériaux synthétiques et des techniques de bioingénierie pour les études *in vitro*, cependant plusieurs limitations sont encore présentes dans les organoïdes, comme l'absence de gradients biochimiques, de forces dynamiques ou encore de topographie. C'est pourquoi, ces dernières années, plusieurs modèles *in vitro* ont été générés afin d'étudier l'épithélium intestinal.

IV. Modèles de culture microfabriqués de l'intestin

La convergence des systèmes de culture d'organoïdes et des techniques de microfabrication développés ces dernières années a mené au développement de divers modèles de cultures microfabriqués d'intestin *in vitro*.

1. Reproduction de la topographie

Comme décrit précédemment, l'épithélium intestinal est un tissu hautement structuré et polarisé, organisé en cryptes et villosités. Afin d'étudier l'impact de cette architecture sur le comportement cellulaire, des scaffolds 3D ont été générés afin de mimer cette topographie spécifique. L'introduction de gradients de signaux biochimiques le long de l'axe crypte/villosité a également été testé dans plusieurs modèles.

Des scaffolds reproduisant les villosités ont été fabriqués en collagène de type 1 par moulage, puisensemencés avec des cellules Caco-2 (Sung et al., 2011) (**Figure 38 A**). Les Caco-2 sont des cellules d'adénocarcinome colorectal humain qui se différencient

spontanément lorsqu'elles atteignent la confluence en un épithélium polarisé présentant des caractéristiques similaires aux entérocytes (Hidalgo et al., 1989). Ces cultures 3D ont permis l'obtention d'un épithélium polarisé en trois dimensions. Ce modèle a révélé que la culture en 3 dimensions sur les scaffolds en collagène 1 entraînait une diminution de la résistance transépithéliale et une augmentation de la perméabilité, avec des valeurs plus proches des valeurs observées *in vivo* par rapport aux cultures en 2 dimensions (Yu et al., 2012). Ce système de culture permet aussi une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation comme les mucines, notamment MUC17 (Kim et al., 2014a). Cette approche a été utilisée pour évaluer la perméabilité de molécules pharmaceutiques (Yu et al., 2012), ainsi que l'effet de MUC17 sur la réponse antibactérienne et l'intégrité de la barrière intestinale (Kim et al., 2014a). Ce système présente donc plusieurs avantages, cependant le scaffold en collagène est progressivement dégradé par les cellules et les structures ne sont pas conservées dans le temps, ce matériau ne permet donc pas de réaliser des cultures prolongées (Yu et al., 2012). Afin de contourner cette limite, des scaffolds en matériaux synthétiques ont été développés.

En utilisant la même technique de moulage, des scaffolds poreux en PLGA (poly-lactide-glycolique acid) reproduisant l'architecture des villosités ont été fabriqués et fixés sur membranes poreuses dans un système de type transwell, ce qui permet l'introduction de gradients de signaux biochimiques. Ces scaffolds supportent la co-culture de cellules Caco-2/HT29-MTX (lignée cancéreuse colorectale modifiée pour la sécrétion de mucus) jusqu'à 28 jours (**Figure 38 B**) (Costello et al., 2014a). Comme précédemment, la culture en trois dimensions permet l'augmentation de certains marqueurs de différenciation comme la phosphatase alcaline.

De plus, la présence d'un gradient d'EGF, le long de l'axe vertical du scaffold en PLGA, augmente significativement l'activité de la phosphatase alcaline et la sécrétion de mucus, ce qui n'est pas observé sur des cultures en 2 dimensions (Costello et al., 2014a). Ce système a également été validé pour la culture de cellules intestinales primaires. Les scaffolds de PLGA ont été recouverts de Matrigel puis les cellules intestinales obtenues à partir de cryptes dissociées ont été cultivées pendant 7 jours en présence de facteurs de croissance (EGF, R-spondin, Noggin et Wnt3a). Une différenciation ainsi qu'une organisation spatiale des cellules ont été observées : les cellules exprimant le lysozyme (marqueurs des cellules de Paneth) restent en bas du scaffold alors que les cellules exprimant la mucine-2 (cellules en gobelet) migrent vers le haut (Costello et al., 2014a). Ce système a été utilisé pour mimer l'invasion

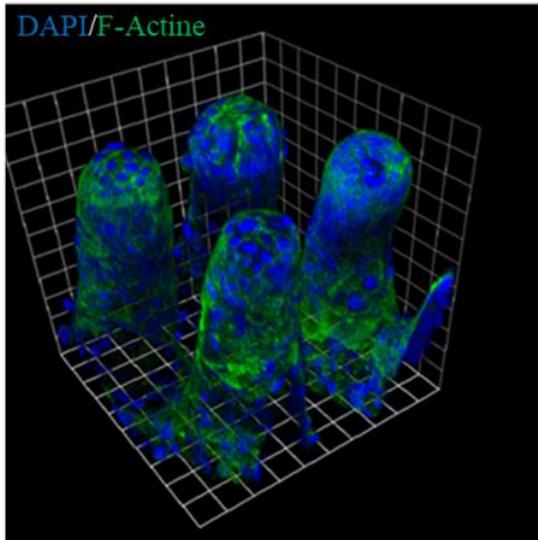
d'agents pathogènes sur la barrière intestinales et évaluer l'effet thérapeutique de probiotiques (Costello et al., 2014b).

Récemment des scaffolds en hydrogel à base d'un mélange de 6,5 % PEG-DA (m/v) /0,3 % acide acrylique (m/v) en présence d'un photoinitiateur (1% Irgacure 2959) ont été fabriqués par photolithographie puis assemblés dans un transwell, les scaffolds ont été fonctionnalisés avec des protéines de la matrice (collagène ou laminine) via la réaction EDC/NHS (décrite p.100) (Castano et al., 2019). Ces structures 3D supportent la croissance de cellules Caco-2 jusqu'à 21 jours et comme observés précédemment, la culture en trois dimensions permet l'obtention d'un épithélium polarisé, exprimant des marqueurs de différenciation avec des valeurs de résistance transépithéliale plus proche de celles obtenues *in vivo*. Cependant l'effet seul de l'hydrogel en 2 dimensions n'a pas été évalué, il n'est donc pas possible de dire si cette amélioration de la différenciation est due à la topographie du scaffold, à la matrice ou aux deux (Castano et al., 2019).

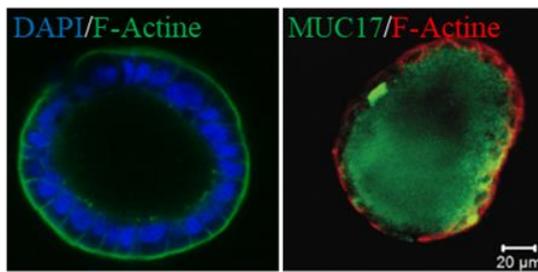
Ces modèles permettent donc de récapituler certains aspects de la topographie intestinale et ont mis en évidence un impact pro-différenciatif de cette architecture. Cependant, les scaffolds générés reproduisent uniquement les villosités mais pas les cryptes et ne récapitulent donc pas totalement la topographie de l'épithélium. En effet, la topographie des cryptes joue un rôle important dans la régulation des cellules intestinales. La culture de cellules Caco-2 sur un support de PDMS mimant des cryptes (puits de 120 µm de profondeur et 50, 100 ou 500 µm de diamètre) cause une diminution de la prolifération, de l'étalement et de l'activité phosphatase alcaline ainsi qu'une augmentation de l'activité métabolique (Wang et al., 2009).

Enfin, une étude récente décrit la génération d'un scaffold en collagène 1 réticulé reproduisant les dimensions de l'épithélium intestinal humain. Le scaffold a été fabriqué par moulage, le moule étant généré par des techniques de lithographie, et le collagène 1 est réticulé de façon covalente grâce à la chimie EDC/NHS, ce qui empêche sa dégradation par les cellules (Wang et al., 2017b) (**Figure 38 C**). Les scaffolds ont ensuite été placés dans des transwells afin de reproduire le gradient inverse de facteurs de croissance, puisensemencés avec des organoïdes. Ces structures permettent la croissance et la différenciation des cellules primaires humaines et cette étude a révélé que même si l'architecture tridimensionnelle favorise l'organisation cellulaire, la présence des gradients de facteurs de croissance est nécessaire pour une ségrégation des cellules prolifératives et immatures dans les cryptes et des cellules différenciées au niveau des villosités (Wang et al., 2017b).

A Scaffold en collagène 1



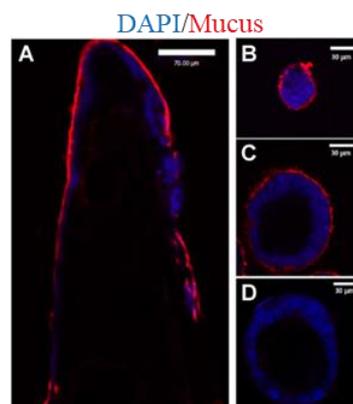
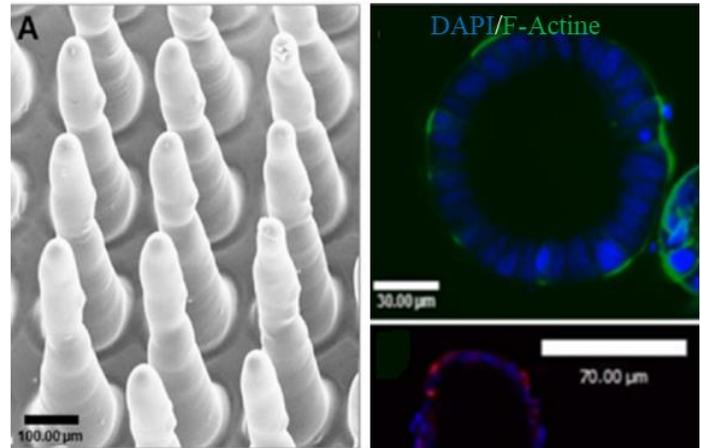
Yu et al. 2012



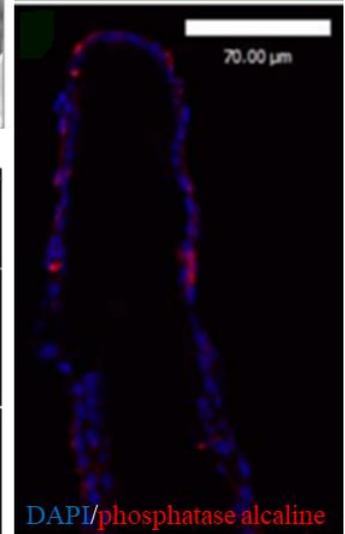
Yu et al. 2012

Kim et al. 2014

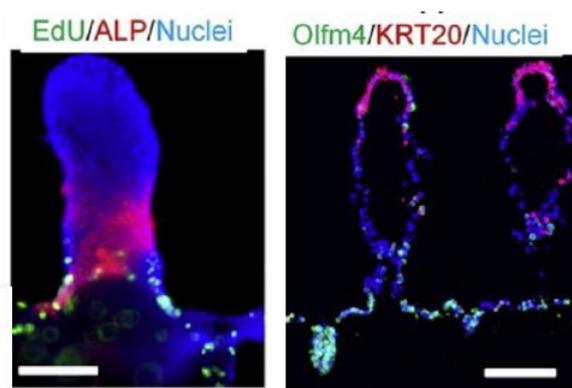
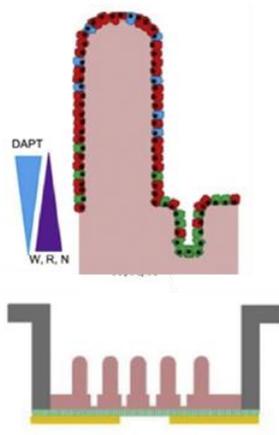
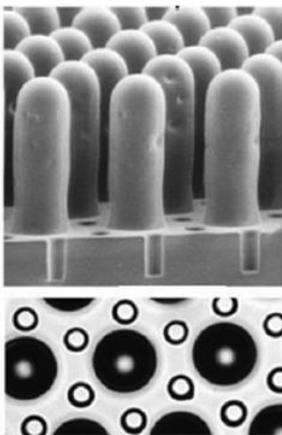
B Scaffold synthétique en PLGA



Costello et al. 2014



C Scaffold en collagène réticulé



Wang et al. 2017

Figure 38 : Modèle de culture reproduisant la topographie intestinale

Plusieurs modèles reproduisant l'architecture tridimensionnelle de l'épithélium intestinal ont été générés grâce à des techniques de microfabrication. Des scaffolds naturels en collagène 1 (A) ou synthétiques en PLGA (B) ont été fabriqués par moulage et supportent la culture et la différenciation de Caco-2. Plus récemment, un scaffold en collagène réticulé et la génération d'un gradient inverse de facteurs de croissance (C) a permis la culture et l'organisation spatiale de cellules intestinale primaire humaine.

En résumé, toutes ces études soulignent donc l'importance de la topographie sur le comportement cellulaire et offrent des modèles plus physiologiques et pertinents pour l'étude de l'épithélium intestinal. Cependant, les techniques de fabrication utilisées reposent principalement sur la génération d'un moule, ce qui offre peu de flexibilité en termes de géométrie et limite la complexité de l'architecture.

2. Gut-On-Chip : reproduction de la composante mécanique

Une autre composante importante du microenvironnement intestinal est la présence de forces mécaniques dynamiques telles que le péristaltisme et les forces de cisaillement générées par le flux. Afin d'étudier l'influence de ces forces sur les cellules intestinales un système microfluidique d'intestin-sur-puce a été généré. Ce système est adapté du modèle de poumons-sur-puce (Huh et al., 2010) et permet la reproduction des mouvements péristaltiques et du flux de liquide (Kim et al., 2012a). La puce consiste en une chambre centrale subdivisée en 2 canaux par une membrane poreuse fine de PDMS. Deux chambres latérales sont connectées à une pompe à vide afin d'exercer des forces cycliques d'étirement pour mimer le péristaltisme (étirement de 10 % à une fréquence de 0,15 Hz) (Kim et al., 2012a). Des cellules Caco-2 ont étéensemencées sur une membrane de PDMS (2D) après dépôt d'une couche de Matrigel et le milieu de culture a été perfusé à un flux de 30 $\mu\text{L}/\text{h}$ (Figure 39). Ce système permet de distinguer les effets provoqués par les forces de cisaillement des effets générés par les forces cycliques d'étirement afin d'étudier leur influence séparément ou collectivement sur l'épithélium. Dans ces conditions de culture dynamique, les Caco-2 forment spontanément des structures de types villosités, et montrent une augmentation de la polarisation de l'actine ainsi qu'une diminution de la résistance transépithéliale. L'écoulement de fluide semble être plus important que la déformation cyclique pour l'induction de la morphogénèse des villosités (Kim et al., 2012a). Les cellules adoptent également une organisation spécifique avec des cellules prolifératives localisées au niveau de la membrane de PDMS et les cellules différenciées exprimant des marqueurs comme la villine, la kératine 20, des mucines ou encore la sucrase isomaltase localisées dans les structures de types villosités (Kim and Ingber, 2013). Ce système a été utilisé afin d'étudier les interactions entre la flore bactérienne et l'épithélium (Kim et al., 2012a). La présence de 2 chambres, supérieure et inférieure permet également de reproduire les interfaces tissulaires. Afin de récapituler la réponse inflammatoire en réponse à des agents pathogènes, des cellules immunitaires circulantes ont été introduites dans le canal inférieur, ce qui a permis de mettre en évidence que les signaux inflammatoires, notamment la sécrétion d'IL8, générés par les cellules immunitaires favorisent les effets délétères des agents

pathogènes sur les Caco-2. Ce modèle mimant la réponse inflammatoire a été utilisé pour évaluer l'effet protecteur d'agents probiotiques sur l'épithélium intestinal (Kim et al., 2016).

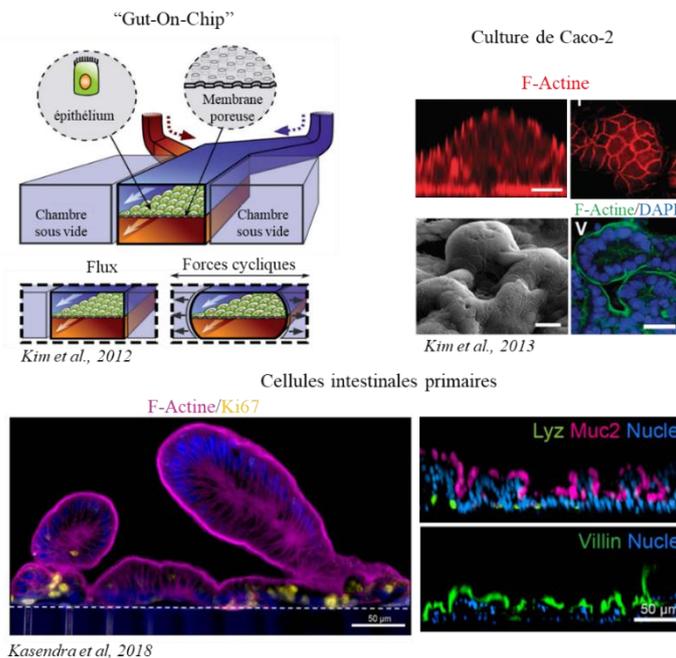


Figure 39 : Modèle d'intestin-sur-puce

Une puce microfluidique permettant la reproduction des mouvements dynamiques de l'intestin a été développée en adaptant le modèle de poumons-sur-puce (Huh et al., 2010). L'introduction de ces forces dynamiques entraîne une amélioration de la différenciation et l'organisation des cellules en structures de type villosités contenant les cellules différenciées alors que les cellules prolifératives restent localisées au niveau de la membrane.

Plus récemment, ce système microfluidique a été adapté pour la co-culture de cellules épithéliales intestinales primaires humaines dans le compartiment supérieur avec des cellules endothéliales primaires humaines dans le canal inférieur. Comme précédemment, les cellules soumises à des contraintes mécaniques se différencient et s'organisent spontanément en cryptes et villosités (Kasendra et al., 2018) (Figure 39). Le mécanisme proposé pour expliquer cette morphogénèse des villosités est la sécrétion basale de l'antagoniste de Wnt, Dickkopf-1 (DKK1) par les cellules épithéliales. En présence d'un flux, DKK1 est enlevé ce qui permet la signalisation Wnt et initie la morphogénèse des villosités, notamment via l'activation du récepteur de Wnt Fz 9, dont l'expression est induite par le flux. Dans des conditions de culture statiques, l'antagoniste sécrété s'accumule dans la chambre basale et inhibe la formation des villosités (Shin et al., 2019).

En résumé cette puce microfluidique a permis de mettre en évidence l'importance des mouvements et des forces dynamiques dans le développement et l'homéostasie intestinale. Ce système constitue également un modèle pertinent pour l'étude des interactions tissulaires ou microbiote-épithélium.

Conclusion

L'avènement de l'ingénierie tissulaire et l'apport des technologies de microfabrication aux modèles de culture a permis le développement de modèles plus physiologiques et pertinents, récapitulant mieux la complexité du microenvironnement physique et biochimique observée *in vivo* ainsi que certaines fonctions des tissus ou organes. Ces systèmes représentent donc un outil puissant pour la médecine régénérative, mais également pour l'étude de mécanismes biologiques ou biophysiques fondamentaux ainsi que pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Ce champ de recherche en est encore à ses premiers pas et les prochaines années devraient voir un développement exponentiel de ce type de technologies.

Hypothèses et objectifs

Ce travail de recherche a porté sur la biologie de l'intestin et plus particulièrement sur l'étude des mécanismes impliqués dans le maintien des cellules souches intestinales et de l'homéostasie tissulaire, ce projet s'articule autour de deux axes principaux.

Le premier objectif de cette thèse a porté sur l'étude du rôle de p57 dans les cellules souches intestinales. p57 est un inhibiteur des complexes cycline/CDK de la famille Cip/Kip, requis pour le développement embryonnaire (Besson et al., 2008). Le gène codant pour p57, *CDKN1C* est également le gène le plus fréquemment réprimé ou muté dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS). Des mutations ponctuelles du gène *CDKN1C* sont identifiées dans environ 8% des cas sporadiques et sont responsables de la majorité des cas familiaux (50 %) de BWS (Eggermann et al., 2014b). Ces mutations sont réparties sur l'ensemble de la séquence codante et ne sont pas limitées au domaine de liaison cycline/CDK (Eggermann et al., 2014b), suggérant donc que p57 joue des rôles indépendants de l'inhibition du cycle cellulaire pendant le développement. Afin d'identifier ces rôles indépendants des CDK, un modèle de souris knock-in a été généré au sein de l'équipe. Les souris expriment une forme mutante de p57 (p57^{CK-}) qui ne peut plus lier les complexes cycline/CDK, le reste de la protéine est complètement fonctionnel. La comparaison des phénotypes des souris p57^{KO} et p57^{CK-} a permis d'identifier des fonctions de p57 indépendantes de l'inhibition du cycle pendant le développement et de mettre en évidence que BWS n'est pas entièrement causé par la perte d'inhibition des CDK due à l'inactivation de p57 (Duquesnes et al., 2016). L'étude comparative des souris p57^{KO} et p57^{CK-} a également permis de mettre en évidence que p57 joue un rôle primordial dans le développement intestinal, de manière indépendante des CDK. En effet environ un tiers des souris p57^{KO} présentent un raccourcissement de l'intestin et une forte désorganisation du tissu, alors que ce phénotype n'est pas observé chez les souris p57^{CK-} (Duquesnes et al., 2016).

L'hypothèse de ce projet est que p57 agit comme un régulateur essentiel de la prolifération et de la spécification des cellules souches intestinales, de façon indépendante de l'inhibition des complexes cycline/CDK. Afin de répondre à cette hypothèse les objectifs de ce projet ont été de (1) : déterminer quelles populations de la crypte intestinale sont affectées par l'absence de p57 grâce à des techniques de traçage génétique et (2) : déterminer le mécanisme moléculaire par lequel p57 contrôle la spécification des cellules souches intestinales via l'identification de nouveaux partenaires. Ces travaux ont permis l'identification

d'une nouvelle fonction de p57 dans les cellules souches intestinales au cours du développement et pourrait expliquer le rôle de p57 dans la tumorigénèse intestinale.

Afin, d'étudier la prolifération et la différenciation des cellules souches intestinales et de leur descendance *in vitro*, le deuxième objectif de ce projet de thèse a été par une approche pluridisciplinaire de **développer un nouveau modèle de culture microfabriqué en 3 dimensions d'épithélium intestinal**. En effet, les modèles de culture en deux dimensions ne récapitulent pas la topographie, le microenvironnement biochimique et mécanique ou l'organisation spatiale des cellules au sein du tissu *in vivo*. Le développement de modèles tridimensionnels tels que les organoïdes permet de récapituler et modéliser certains aspects de l'organisation et de l'hétérogénéité tissulaire, cependant ces modèles présentent toujours certaines limites comme l'absence de lumière, l'impossibilité de créer des gradients biochimiques ou de générer des forces mécaniques ou encore une faible reproductibilité liée à l'utilisation du Matrigel (Fatehullah et al., 2016). Les objectifs de ce projet ont donc été : **(1)** de développer un nouveau matériau synthétique photopolymérisable supportant la culture cellulaire, **(2)** de mettre en forme ce matériau par de nouvelles technologies d'impression 3D haute résolution afin de créer des supports de culture reproduisant l'architecture tridimensionnelle de l'intestin, et **(3)** d'évaluer l'impact de la topographie 3D sur le comportement cellulaire.

Résultats

I. 1^{er} objectif : rôle de p57 dans la maintenance et la spécification des cellules souches intestinales.

Introduction

p57^{kip2}, codé par le gène *CDKN1C*, est un inhibiteur des complexes cycline/CDK appartenant à la famille Cip/Kip avec p21^{Cip1} et p27^{Kip1}. De par son activité inhibitrice des CDK, p57 agit comme un régulateur négatif du cycle cellulaire (Besson et al., 2008). Contrairement aux autres inhibiteurs de CDK, p57 joue un rôle crucial au cours du développement embryonnaire, ce qui est illustré par la létalité périnatale des souris p57^{KO} (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Les animaux p57^{KO} présentent de nombreuses anomalies du développement dont certaines sont retrouvées dans le syndrome génétique Beckwith-Wiedemann (BWS) (Zhang et al., 1997). En effet, la répression épigénétique ou les mutations de *CDKN1C* entraînant une perte de fonction ou d'expression de p57 représentent les principales causes de BWS (Eggermann et al., 2014b). Les mutations décrites couvrent l'ensemble de la partie codante et ne sont pas restreintes au domaine de liaison aux cycline/CDK (Brioude et al., 2015; Eggermann et al., 2014b), suggérant que des rôles indépendants de l'inhibition des cycline/CDK par p57 sont impliqués dans le développement de BWS. De plus, un nombre croissant d'études ont montré qu'en plus de sa fonction inhibitrice du cycle cellulaire, p57 intervient dans des processus biologiques variés via son interaction avec de nombreux partenaires (Pateras et al., 2009). La génération d'un modèle de souris knock-in p57^{CK-}, dans lequel p57 ne peut plus lier les complexes cycline/CDK, a fourni la preuve génétique de ces fonctions indépendantes des CDK et a permis de mettre en évidence que BWS résulte en parti de la dérégulation de fonctions CDK-indépendantes de p57 (Duquesnes et al., 2016). Cette étude a également permis de mettre en évidence le rôle crucial de p57 dans le développement intestinal de manière indépendante des CDK (Duquesnes et al., 2016). En effet, les souris p57^{KO} présentent un raccourcissement intestinal et une désorganisation tissulaire (Susaki et al., 2009; Yan et al., 1997) qui n'est pas observé chez les souris p57^{CK-} (Duquesnes et al., 2016). Cependant, à ce jour seulement deux études ont décrit la présence de p57 au niveau intestinal et sa fonction dans le développement reste à élucider (Barriga et al., 2017; Riccio et al., 2008). Au niveau des progéniteurs intestinaux, il a été montré que l'expression de p57 est inhibée par la signalisation Notch, afin de favoriser la

prolifération des progéniteurs et d'éviter une différenciation précoce (Riccio et al., 2008). Une étude plus récente a également identifié la présence de p57 dans la population de réserve CBC quiescentes Mex3a^{High} (Barriga et al., 2017).

L'épithélium intestinal est organisé en cryptes et villosités et présente un très fort taux d'auto-renouvellement avec un turnover de 5 à 7 jours (Clevers, 2013a). Ce renouvellement est assuré par les cellules souches intestinales, localisées en bas des cryptes, qui prolifèrent pour donner des progéniteurs, qui à leur tour se divisent trois à quatre fois avant leur différenciation terminale, tout en migrant vers le haut des villosités. Une fois le haut des villosités atteint, les cellules tombent dans la lumière du tube digestif et meurent par d'anoïkis (Barker, 2014; Clevers, 2013a). Deux types de cellules souches intestinales ont été décrites, les CBC prolifératives responsables de l'auto-renouvellement constant (Barker et al., 2007), et les cellules souches +4 de réserve mobilisées en cas de dommages afin de régénérer l'épithélium (Tian et al., 2011). Plusieurs études ont démontré qu'il existe un échange dynamique entre ces deux populations de cellules souches et que chacune peut reconstituer l'autre (Barriga et al., 2017; Montgomery et al., 2011 ; Takeda et al., 2011). La maintenance des cellules souches intestinales est cruciale pour l'homéostasie tissulaire cependant malgré de nombreuses études, les mécanismes gouvernant la spécification de ces dernières restent mal compris.

L'objectif de ce travail a été de déterminer par quels mécanismes p57 contrôle le développement de l'intestin.

Matériel et Méthodes

Anticorps, plasmides et réactifs

Les anticorps de souris anti-PCNA (PC10-sc59), -mSin3a (G-11, sc-5299), -HDAC7 (A-7, sc-74563), -Myc (9E10, sc-40) et les anticorps de lapin anti-p57 (H-91, sc-8298), -Myc (A-14, sc-789) ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology. Tous les anticorps de Santa Cruz sont utilisés au 1/1000^{ème} en western blot et au 1/100^{ème} pour les marquages histologiques.

Les anticorps de souris anti-Ascl2 (8F1, MAB4417, dilution au 1/100^{ème} pour les PLA) et de lapin anti-Sox9 (AB5535, dilution au 1/200^{ème} pour les marquages histologiques) et -p57 (06556, dilution 1/1000^{ème} en immunoblot) ont été achetés chez Merck Millipore.

Les anticorps de souris anti-β Actine (A2228, dilution 1/10000 en immunoblot) et de lapin anti-Ascl2 (SAB1305026, dilution au 1/100^{ème} pour les PLA), -HDAC7 (SAB4502143, dilution au 1/100^{ème} pour les PLA) et -p57 (P0357, dilution au 1/500^{ème} pour les PLA) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Les anticorps de lapin anti-mSin3a (PA1-870, 1/2000^{ème} pour les western blot et au 1/100^{ème} pour les PLA), - HDAC7 (PA5-29937, 1/2000^{ème} pour les western blot), - Ki-67 (SP6, RM-9106-S1, dilution 1/100^{ème} pour les marquages histologiques) ont été achetés chez Thermo Scientific.

Les anticorps de lapin anti-caspase-3 clivée (Asp175; 5A1E, dilution 1/100^{ème} pour les marquages histologiques) et anti-Olfm4 (D6Y5A, dilution au 1/400^{ème} pour les marquages histologiques) ont été achetés chez Cell Signalling.

L'anticorps de lapin anti-tGFP (AB513, dilution au 1/1000^{ème} pour les immunoblots) a été acheté chez Evrogen.

L'anticorps de chèvre anti-GFP (GTX26673, dilution au 1/100^{ème} pour les marquages histologiques) a été acheté chez Gentex.

L'anticorps de lapin anti-Id1 (BCH-1/#37-2, dilution au 1/400^{ème} pour les marquages histologiques) a été acheté chez BioCheck.

L'anticorps de souris anti-Grb2 (610112, dilution 1/1000^{ème} en immunoblot) a été acheté chez BD Transduction Laboratories.

Les anticorps secondaires dirigés contre les Ig totales ou les chaînes légères d'Ig de souris et lapin et conjugués à la horseradish peroxydase (HRP) (715-035-150, 711-035-152) ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch et utilisés au 1/10000^{ème}. Les anticorps secondaires couplés au cyanines anti-souris cyanines -2,-3,-5 (respectivement 715-225-150, 715-175-150, 715-165-150), anti-lapin cyanines -2,-3 (respectivement 715-255-152, 711-165-152) et anti-chèvre cyanines -2,-3 (respectivement 705-225-147, 705-165-147) ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch et utilisé au 1/400^{ème}.

La phalloïdine couplée au FITC est utilisée au 1/500^{ème} est achetée chez Interchim (FP-47548A).

Les séquences codantes pour p57^{WT}, p57^{CK-} et Ascl2 ont été sous clonées dans un vecteur pcDNA3.1-Hygro (Invitrogen). Les séquences des promoteurs GAPDH, Sox9, Lgr5 et Phox2a ont été sous clonées dans un vecteur pZs-Green1-Dr codant pour une forme déstabilisée de la GFP (Clontech). Le vecteur codant pour Ascl2-tGFP a été acheté chez Origene.

Modèles animaux

Les souris p57^{KO} et p57^{CK-}, décrites précédemment (Duquesnes et al., 2016 ; Susaki et al., 2009), maintenus dans un fond génétique 129S4/C57BL6J ont été croisées avec des souris hétérozygotes Lgr5^{+eGFP-creERT} (JAX #008875) ou des souris homozygotes Hopx^{3xFlag} (JAX

#029271). Les souris $Lgr5^{+/eGFP-creERT}$ et $Hopx^{3xFlag}$ sont maintenues dans un fond C57BL6J. Les lignées reportrices ont été achetées chez Jackson laboratory. Les souris ont été maintenues et les procédures effectuées conformément aux réglementations européennes et nationales.

Culture cellulaire

Les cellules HEK293 sont cultivées dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (Sigma, D6429) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (FBS, Sigma), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Sigma, M7145) et 2 µg/mL de pénicilline/streptomycine (Sigma, P4333). Les cellules SW480 sont cultivées dans du milieu RPMI 2 g/L glucose (Sigma, R8758) supplémenté avec 10%, de Sérum de Veau Fœtal (Sigma), 0,1 mM d'acides aminés non essentiels, 2 µg/mL de pénicilline/streptomycine et 2,5 g/L D-Glucose (Sigma, G7021). Toutes les cellules ont été maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules HEK293 ont été transfectées par la méthode de phosphate de calcium pour 24 à 72 h avec une confluence d'environ 40%. Les cellules SW480 sont transfectées par le réactif JetPrime et maintenues en sélection par hygromycine à 250 µg/mL.

Histologie

Les intestins ont été fixés dans de la formaline 10% à 4°C. Pour la cryosection, les intestins ont été fixés pendant 2 h, incubés dans une solution de sucrose 30% sur la nuit puis inclus en OCT. Pour les coupes paraffines les tissus ont été fixés en formaline 10% pendant 4h, incubés dans de l'éthanol 70% pendant 4h puis inclus en paraffine.

Pour les tissus inclus en paraffine, des coupes de 5µm ont été réalisées sur un microtome (Microm Microtech) et placées sur des lames SuperFrost Plus (Thermo Scientific). Les tissus ont été déparaffinés et réhydratés puis utilisés pour une coloration Hématoxyline/Eosine (H&E) ou pour immunomarquage. Le démasquage des antigènes a été réalisé avec des solutions de citrate de sodium (10 mM, pH 6) (marquages Ki67, caspase 3 clivée, p57, PCNA) ou High pH (H-3301, Vector Laboratories) (marquages Olfm4, Id1, Sox9, PCNA) pendant 30 min dans un cuit vapeur. Pour les immunofluorescences, les coupes ont été bloquées avec du PBS-0.2% TritonX-100-3% BSA-10% sérum d'âne pendant 30 min à 2h dans une chambre humide à température ambiante. Les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C ou 1h à 37°C puis lavées 2 fois 5 min dans du PBS-0.2% Triton X-100 puis une fois 5 minutes au PBS. Les lames sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires conjugués aux cyanines -2 -3 pendant 30 min à 37°C en chambre humide, puis lavées 3 fois 5 min dans du PBS, le premier bain contient du Hoechst 33342 (0,1 µg/mL) afin de marquer les noyaux. Enfin, les

lames sont montées avec du Gelvatol (20% glycerol (v/v), 10% polyvinyl alcohol (m/v), 70 mM Tris pH 8).

Pour les immunohistochimies, après le démasquage l'activité peroxydase endogène est bloquée par incubation des coupes pendant 30 min avec une solution de PBS-3% H₂O₂-1% Azide de Sodium puis les coupes sont lavées 3 fois à l'eau. Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de blocage (Vector Horse serum solution S-2012). L'anticorps primaire est incubé sur la nuit à 4°C ou 1 h à 37°C puis lavé 2 fois 5 min dans du PBS-0.2% Triton X-100 et une fois 5 min dans du PBS. Les coupes ont été incubées 30 min à 37°C avec le réactif Impress (Anti-Lapin ou Souris) (Vector Laboratories, MP-7401 ou MP-7402), lavées 3 fois 5 min dans du PBS-0.2% Triton X-100 et une fois 5 min dans du PBS. Le marquage est visualisé en utilisant le chromogène 3'3'-diaminobenzidine (ImmPact DAB, Vector Laboratories SK-4105). Les noyaux sont contremarqués avec l'hématoxyline. Les lames sont ensuite déshydratées et montées avec la résine de montage Permount (FisherScientific SP15-500).

Les images des sections paraffines ont été acquises sur un microscope Eclipse 90i (Nikon) équipé avec une caméra Digital Ds-Fi1 (Nikon) en utilisant le logiciel NIS-Br.

Les tissus inclus en OCT ont été congelés à -80°C puis des coupes de 12 µm ont été réalisées avec cryotome (Cryostat Leica CM1950), et déposées sur lames SuperFrost Plus, puis conservées à -20°C. Les coupes sont décongelées puis incubées dans une solution de blocage (10% sérum d'âne) pendant 30 min. Les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C ou 1 h à température ambiante puis lavées 3 fois 5 min dans du PBS-0.1% Triton X-100. Les lames sont ensuite incubées avec les anticorps secondaires conjugués aux cyanines-2, -3 pendant 30 min à température ambiante, puis lavées 3 fois 5 min dans du PBS-0.1% Triton X-100. Les noyaux sont marqués avec le Hoechst 33342 (0,1 µg/mL). Enfin les lames sont montées avec du Gelvatol. Les images des cryosections ont été réalisées sur microscope confocal SP8 Leica inversé ou sur microscope spinning disk inversé (microscope Leica inversé DMI8 équipé avec une tête confocale CSU-X1-M1N, Yokogawa) et traitées avec le logiciel Image J.

Cytométrie en flux

Les intestins des embryons ont été disséqués au stade E18.5, découpés en morceaux à l'aide d'une lame de rasoir puis incubés avec de la Dispase (1U/mL) (Sigma, D4693) et de la DNase I (0,2 mg/mL) (Euromedex, 1307) dans du PBS à 37°C pendant 15 min sous agitation (800 rpm). Les suspensions de cellules uniques ont été recueillies, filtrées sur un tamis de 40 µm puis

lavées au PBS (centrifugation 10 min à 2000 rpm). Les cellules ont été resuspendues du PBS-2% SVF. Les cellules mortes ont été marquées par le 7-AAD (0,5 µg/mL) (Sigma, A9400) pendant 30 min à 37°C. Afin d'évaluer le contenu en ADN les cellules ont été marquées avec du Hoechst 33342 (0,1 µg/mL) pendant 30 min à 37°C. Pour déterminer le pourcentage de cellules GFP⁺, la population totale est gatée sur les singulets et les cellules vivantes. Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées sur un cytomètre CytoFlex S (Beckman Coulter) et analysées avec le logiciel FlowJo. Toutes les analyses ont été réalisées en aveugle du génotypage.

Isolation des cryptes et tri de cellules souches intestinales adultes

Les intestins de souris adultes ont été prélevés puis les cellules ont été isolées par dissociation mécanique et enzymatique. Brièvement, les intestins ont été ouverts longitudinalement puis incubés dans de l'HBSS-30 mM EDTA pendant 15 min à 37°C. L'épithélium est détaché de la muqueuse par agitation puis récupéré par centrifugation. Les cellules sont incubées avec de la Dispase (1U/mL) et de la DNase 1 (0,2 mg/mL) pendant 20 min à 37°C. Les cellules isolées sont récupérées par centrifugation puis resuspendues dans de l'HBSS-5% SVF. Avant tri, la suspension cellulaire est filtrée sur un tamis 70 µm puis 40 µm puis les cellules mortes sont marquées par le 7-AAD (0,5µg /mL) pendant 30 min à 37°C. Le tri est réalisé sur un FACS BD AriaFusion. Les cellules triées sont centrifugées 10 min, 1500 rpm à 4°C puis les culots sont lysés pour la RT-qPCR.

Reverse transcriptase et qPCR

Les culots cellulaires ont été lysés dans du TriReagent (T9424, Sigma) et les ARN ont été extraits selon les recommandations du fournisseur. Les ARN ont été quantifiés au Nanodrop et les cDNA ont été synthétisés en utilisant la SuperScript IV (Thermo Fisher) selon les instructions du fournisseur avec 1µg d'ARN. Un contrôle négatif sans Reverse Transcriptase a été réalisé pour chaque expérience. Les qPCR ont été réalisées sur un appareil Biorad CFX96 en utilisant le Supermix SsoFast EvaGreen (BioRad) avec des amorces à une concentration finale de 500mM et une quantité de cDNA correspondant à 2,5 ng d'ARN par réaction. Les valeurs de Ct ont été générées avec le logiciel BioRad CFX96 Real-Time PCR et les données ont été analysées puis normalisées en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ avec GAPDH comme gène de ménage. Toutes les valeurs de Ct sont normalisées par rapport à l'expression génique de cellules GFP négatives dans une même expérience. Les amorces utilisées sont présentées dans la Table 7.

	Forward	Reverse
mp57	CGAGGAGCAGGACGAGAATC	GAAGAAGTCGTTTCGCATTGGC
mMex3a	ACACCACGGAGTGCCTTC	GTTGGTTTTGGCCCTCAGA
mLgr5	AGGCTGCCAAAACTTCAGA	TAACCCAGTCACAGGGAAGG
mAscl2	CCGCGGTAGAGTACATTCGT	TGCTTTCCTCCGACGAGTAG
mOlfm4	GGACCTGCCAGTGTTCTGTT	GACCTCTACTCGGACCGTCA
mMuc2	TGATGCCCATTTGAGGTGGAG	CTGGCCCTTTGTGTTGTTGC
mMuc4	GCTACAGAGCCAAGTGGACAC	AAGCCCATGAGCACCCGGTT
mSucrase	GCTGGTCGATGGGGAGGA	CCAACGAGCACAGAGGTGGTAT
mAtoh1	GCTTCCTCTGGGGGTTACTC	CTGTGGGATCTGGGAGATGT
mHes1	CCAGCCAGTGTCAACACGA	AATGCCGGGAGCTATCTTTCT
mHopx	CTTCAACAAGGTCAACAAGCAC	AGGCGCTGCTTAAACCATT
mTert	GCAGGTGAACAGCCTCCAGACAG	TCCTAACACGCTGGTCAAAGGGAAGC
mSox9	AGTACCCGCATCTGCACAAC	CGTTCTTCACCGACTTCCTC
mGAPDH	GGGAAATTCAACGGCACAGT	AGATGGTGATGGGCTTCCC

Table 7 : Liste des amorces de qPCR

Co-Immunoprécipitation

Les cellules sont lysées dans un tampon d'immunoprécipitation (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 1% NP-40, 0,1% Tween-20, 10% glycerol, complété avec 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 1 mM DTT, et 10 mg/mL d'inhibiteurs de protéases Aprotinine, Bestatine, Leupeptine et Pepstatine A). Les lysats sont soniqués 10 s puis centrifugés à 12 500 g pendant 5 min à 4°C. Les surnageants sont récoltés et la concentration protéique est déterminée par dosage Bradford.

Les lysats (500 μ g) sont incubés avec 3 μ g de l'anticorps d'intérêt et 12 μ L de billes de sépharose liées à un mélange de protéines A/G (IPA300, Repligen et PC-G5, Generon), pendant 4h sous agitation douce à 4°C. Les billes sont lavées trois fois dans 750 μ L de tampon d'immunoprécipitation (1 min à 1000 g) puis les culots sont repris dans 12 μ L de tampon Laemmli. Les échantillons sont chauffés 3 min à 96 °C avant d'être déposés sur gel de polyacrylamide à une concentration adaptée à la taille des protéines à détecter. Pour les immunoprécipitations avec des protéines surexprimées, 1/5^{ème} de lysat est utilisé pour le contrôle de charge.

Les anticorps utilisés pour les immunoprécipitations sont : R α tGFP (AB513), M α Myc (9E10, sc-40), R α p57 (H-91, sc-8298), R α HDAC7 (PA5-29937) et R α Sin3a (PA1-870).

Western Blot

Les lysats et les immunoprécipitations sont préparés comme décrit précédemment. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur des membranes de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Immobilon-P, Millipore). Les membranes sont ensuite bloquées 1 h dans la solution de blocage (PBS-T : PBS-0,1% Tween-20, complétement de 5% lait écrémé sans acide gras) puis incubées avec l'anticorps primaire dilué dans solution de blocage sur la nuit à 4°C. Les membranes sont lavées trois fois dans du PBS-T et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (1/10000^{ème}) 3 h à température ambiante. Enfin, les signaux sont visualisés par des agents de détection de chémiluminescence (Millipore, BioRad) sur films autoradiographiques (Blue Devil).

Transcription Reporter Assay

Les cellules HEK293ensemencées sur des plaques 24 puits (45 000 cellules/puits) sont co-transfectées pour 48 h avec 50 ng de plasmide reporteur (pZsGreen DA (sans promoteur, contrôle négatif), pZsGreen pGAPDH (contrôle positif), pZsGreen pSox9, pZsGreen pPhox2a ou pZsGreen pLgr5), 50 ng de plasmide pcDNA3.1 Ascl2 et pcDNA3.1 p57^{WT} (0, 100 ou 200 ng) ou pcDNA3.1 hygro p57^{CK-} (0, 100 or 200 ng). Le milieu est changé 24 h après la transfection. Après 24 h, 9 images par puits ont été prises en contraste de phase et fluorescence avec le microscope automatisé Incucyte FLR (Essen Bioscience), avec un objectif 20X. Le nombre de cellules fluorescentes a été quantifié sur chaque image en utilisant le logiciel Incucyte Software (v2001A) et les valeurs ont été normalisées avec les valeurs de fluorescence obtenues avec le plasmide reporteur pGAPDH pour chaque condition.

Immunoprécipitation de chromatine

Les cellules SW480 ont été cultivées jusqu'à confluence. Le milieu a été remplacé par du PBS et les cellules ont été fixées avec 1% de formaldéhyde pendant 10 min à température ambiante afin de lier covalamment les complexes protéines/ADN. La fixation a été stoppée par ajout de glycine à une concentration finale de 0,125 M pendant 5 min. Les cellules ont été rincées avec du PBS froid puis grattées dans du PBS + inhibiteurs de protéases (Aprotinine, Bestatine, Leupeptine et Pepstatine A à 10 µg/mL). Les cellules ont ensuite été culottées à 3000 rpm pendant 10 min et lysées sur glace pendant 30 min avec 200 µL/1.10⁶ cellules de tampon de lyse (10 mM Tris-HCL pH 8, 0,25% Triton-X100, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Sodium butyrate complétement avec 20 mM β-glycérophosphate, 10 µM sodium orthovanadate et inhibiteurs de protéases à 10µg/mL). Les lysats ont été homogénéisés avec un Dounce sur la

glace en faisant 20 aller-retours pour aider à la libération de la chromatine. Les cellules ont été centrifugées 5 min à 3000 rpm et les culots contenant l'ADN et les protéines liées ont été repris dans 300 µL/1.10⁶ cellules de tampon de sonication (10 mM Tris-HCL pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Sodium butyrate complétementé avec 20 mM β-glycérophosphate, 10 µM sodium orthovanadate, 1% SDS et inhibiteurs de protéases à 10 µg/mL) et incubés dans la glace pendant 10 min. La chromatine est fragmentée par sonication 16 cycles de 30 s on/20 s off d'amplitude 40% avec un sonicateur Vibra-cell VCX130 Sonicator (Sonic). Le sonicat est centrifugé 10 min à 14000 rpm à 4°C, le SDS est éliminé et le surnageant contenant l'ADN est récupéré. La digestion de la chromatine a été vérifiée sur gel d'agarose 1% et la concentration d'ADN a été déterminée au NanoDrop. Pour chaque immunoprécipitation (IP), 200 µg de chromatine ont été utilisés et 10 % du volume ont été conservés pour le contrôle input. Le volume de chaque IP a été complété à 800 µL avec du tampon de sonication puis converti en tampon RIPA par ajout de 80 µL de 10% Triton-X100, 23 µL de NaCl 5mM et 8 µL de sodium deoxycholate (DOC) 10 % dans chaque tube. Pour chaque IP, 4 µg de l'anticorps d'intérêt et 20 µL de billes magnétiques Magna CHIP Protein A/G (Millipore) sont ajoutés et les échantillons sont incubés sur la nuit à 4°C sous agitation douce. Les IP sont lavées 3 fois avec du tampon low salt (10 mM Tris-HCL pH 8, 0,1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,1% DOC, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Sodium butyrate complétementé avec 20 mM β-glycérophosphate et 100 µM sodium orthovanadate), 3 fois avec du tampon high salt (même tampon avec 500 mM de NaCl), 2 fois dans du tampon LiCl (0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% DOC, 10 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA, 10 mM Sodium butyrate et 100 µM sodium orthovanadate) puis 2 fois dans du tampon Tris-EDTA. Les complexes ADN/protéines ont ensuite été purifiés et élués avec le kit IPure (Diagenode) selon les recommandations du fournisseur. Les qPCR sont ensuite réalisées avec 20 ng d'ADN par réaction comme décrit précédemment. Les amorces utilisées pour l'amplification des promoteurs sont données Table 8.

	Forward	Reverse
Lgr5	TCTCCAGGTCTGGTGTGTT	AGTCCACCCTGAGCAACATC
Sox9	GTAAACTCGGCTACGCATTA	CCACCTCCTCCGACATTTCTTT
EphB3	GTCTTGTCATTGCGGTAG	CACTGGGCTGCGTATTTAG

Table 8 : Amorces utilisées pour les qChIP

Proximity Ligation Assay

Les expériences de PLA ont été réalisées en utilisant le kit Duolink in situ fluorescence technology (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les cellules SW480 ont étéensemencées sur des lamelles de verres à une densité de 25 000 cellules/cm² et cultivées pendant 2 jours. Les cellules ont été fixées avec 4% paraformaldéhyde pendant 20 min à 37°C puis perméabilisées avec PBS-0,2% Triton X100 pendant 3 min. Les cellules sont incubées avec la solution de blocage Duolink 30 min à 37°C puis incubées avec les différentes combinaisons d'anticorps primaires 1 h à 37°C en chambre humide. Les anticorps suivants ont été utilisés pour la PLA : lapin anti-p57 (Sigma P0357, 1/500), Ascl2 (Sigma SAB1305026, 1/100), HDAC7 (Sigma, SAB4502143, 1/100) et souris anti-mSin3a (G-11, sc-5299 1/100), HDAC7 (A-7, sc-74563 1/100), Ascl2 (Millipore 8F1, MAB4417, 1/100). Les cellules ont ensuite été incubées avec les sondes de PLA anti-Rabbit PLUS (DUO92002) et anti-Mouse MINUS (DUO92004) pendant 1 h à 37°C. Les réactifs Duolink Detection Reagent Red (DUO9008) ont été utilisés selon les recommandations pour la détection du signal. Après cette étape d'amplification, les cellules ont été incubées avec la Phalloïdine-A488 au 1/500^{ème} pendant 30 min à 37°C, l'ADN a été marqué avec du Hoechst 33342 (0,1 µg/mL). Les images ont été acquises sur un microscope Eclipse 90i (Nikon) équipé avec une caméra Digital Ds-Qi2 (Nikon) en utilisant le logiciel NIS-Br.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism Graphpad 6.0 sur au moins trois animaux ou trois expériences indépendantes. La comparaison entre deux groupes est réalisée avec un test Mann-Whitney. La comparaison entre trois groupes ou plus est réalisée avec un test ANOVA suivi d'une correction de Bonferroni pour comparaisons multiples. Les données sont présentées avec la moyenne \pm SEM. Les symboles statistiques utilisés sont : ns : $p > 0.05$; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$; **** : $p \leq 0.0001$.

Résultats

1. Rôle de p57 dans les cellules souches intestinales

1.1. Altération du développement intestinal chez les souris p57^{KO}

Des travaux récents de l'équipe ont montré que p57 joue un rôle primordial dans le développement intestinal de façon indépendante de l'inhibition des CDK (Duquesnes et al., 2016). En effet, environ 30% des souris p57^{KO} présentent un raccourcissement ou une troncation de l'intestin (Susaki et al., 2009; Yan et al., 1997), cependant ce phénotype n'a jamais été observé chez les animaux mutants p57^{CK-} (Duquesnes et al., 2016) (Figure 40 A-C). De plus, des marquages hématoxyline/éosine (H&E) ont révélé une forte désorganisation de l'épithélium chez les animaux p57^{KO} (Figure 40 D), a contrario les mutants p57^{CK-} présentent un phénotype similaire aux animaux sauvages (WT) avec un développement intestinal normal (Figure 40 A-D) (Duquesnes et al., 2016).

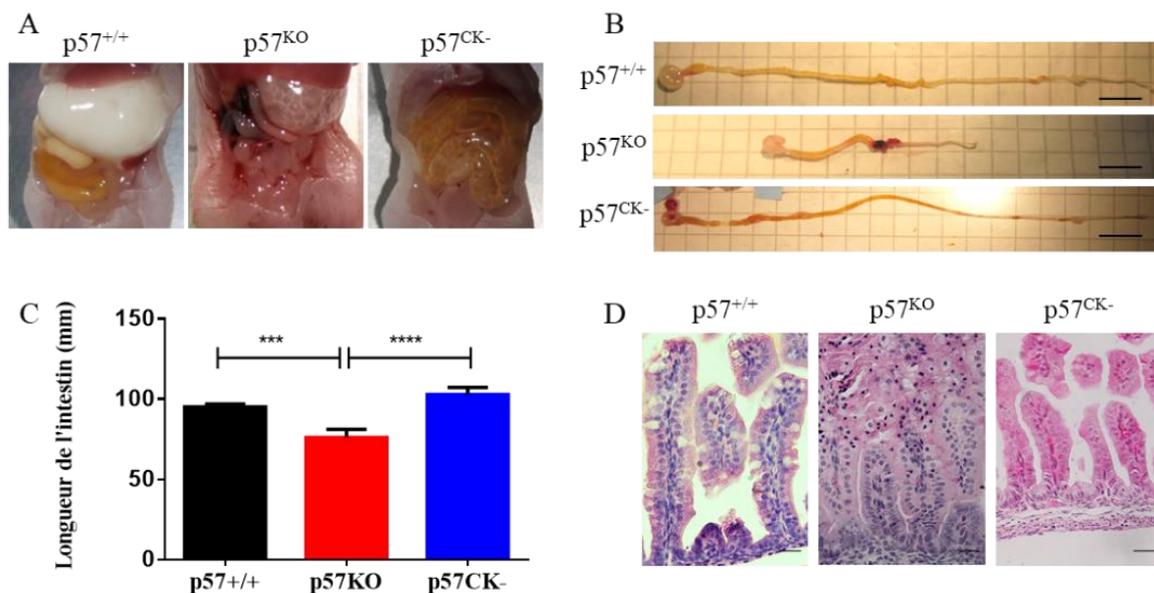


Figure 40 : p57 joue un rôle essentiel dans le développement intestinal indépendamment des CDK

Les souris p57^{KO} présentent un fort raccourcissement intestinal ainsi qu'une désorganisation tissulaire. Ce phénotype est absent chez les souris knock-in p57^{CK-} (A,B). Photos représentatives des abdomens (A) et des intestins (B) des souris p57^{WT}, p57^{KO} ou p57^{CK-} à P0, barre d'échelle = 1 cm. (C) graphe représentant la comparaison de la longueur de l'intestin suivant le génotype p57 (p57^{WT} (n=60), p57^{KO} (n=29) ou p57^{CK-} (n=25)). (D) photos représentatives de marquages H&E à E18.5 montrant des altérations de morphologie de l'épithélium intestinal chez les souris p57^{KO}, barre d'échelle = 50 μ m.

Ces défauts de développement peuvent résulter d'un défaut de prolifération des cellules épithéliales, la prolifération a donc été évaluée grâce à un marquage PCNA (**Figure 41 A**). Ces marquages montrent une forte augmentation de la prolifération au niveau des domaines intervillositaires chez les souris $p57^{KO}$, alors que les souris $p57^{CK-}$ présentent une prolifération similaire aux souris sauvages. Cette augmentation de prolifération n'est donc pas causée par la perte d'inhibition des CDK. Ce résultat a été confirmé par un marquage Ki67 (**Figure 41 B-C**), de la même façon, une forte augmentation du nombre de cellules $Ki67^+$ a été observée en absence de p57 mais pas chez les souris knock-in $p57^{CK-}$. Une augmentation de l'apoptose a également été observée au sommet des villosités chez les souris $p57^{KO}$ (**Figure 41 D**).

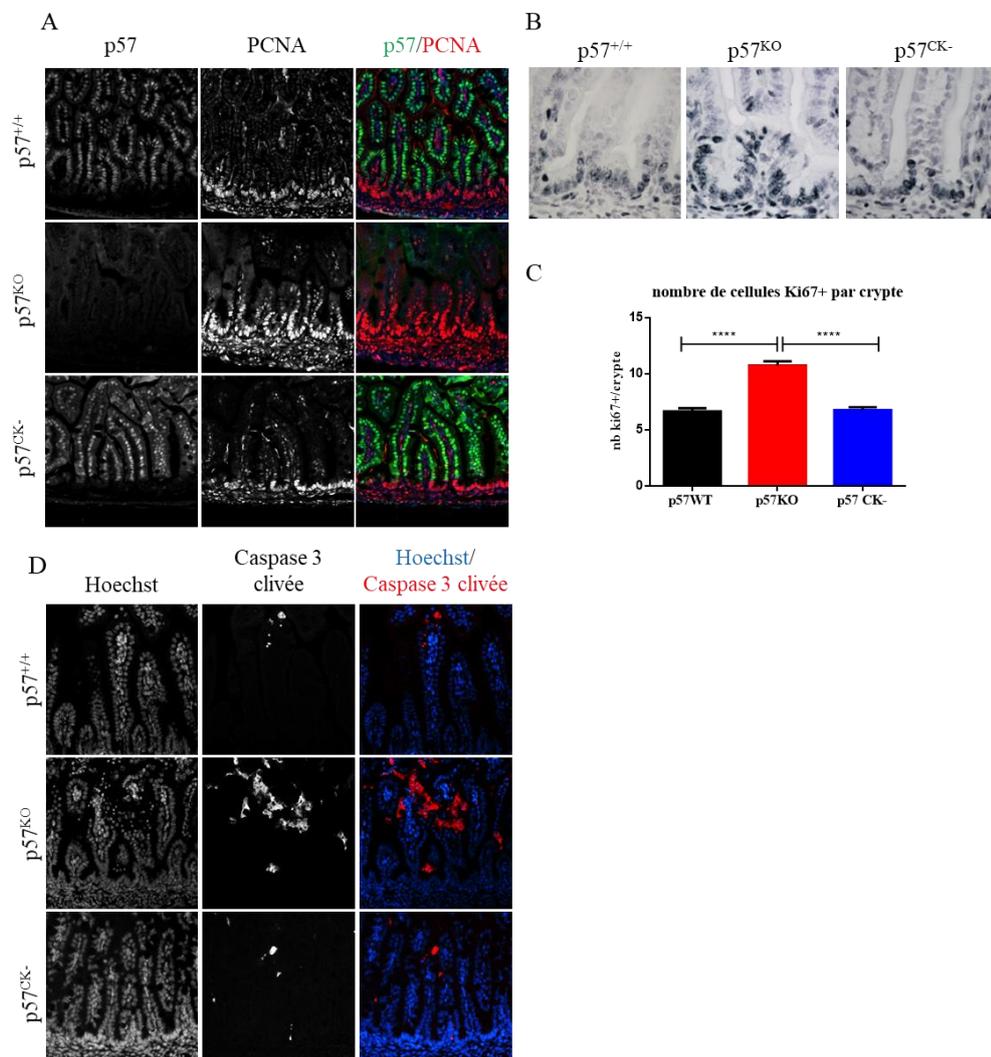


Figure 41 : Augmentation de la prolifération dans les cryptes en absence de p57

Des coupes intestinales d'embryons à E18.5 ont été marquées contre PCNA (A) et Ki67 (B) (bleu). (C) graphe représentant le nombre de cellules $Ki67^+$ par crypte chez des souris $p57^{WT}$ (n=7), $p57^{KO}$ (n=6) ou $p57^{CK-}$ (n=3). Un immunomarquage de caspase 3 clivée a été réalisé afin d'évaluer l'apoptose (D).

Aucun défaut de différenciation ni de localisation des cellules de Paneth (marquage lysozyme), des entérocytes (marquage villine) ou des cellules entéroendocrines (marquage contre la chromogranine A) n'a été observé chez les souris p57^{KO} (données non montrées). Ces données suggèrent donc une dérégulation du compartiment immature en absence de p57.

1.2.Dérégulation des cellules souches intestinales

Afin de déterminer quelle population cellulaire est affectée par l'absence de p57, des marquage Sox9 ont été réalisés (**Figure 42**). En effet, les CBC expriment faiblement Sox9 (Sox9^{Low}) en comparaison aux cellules souches de réserves qui l'expriment fortement (Sox9^{High}) (Formeister et al., 2009 ; Van Landeghem et al., 2012). Nos résultats montrent que la perte de p57 entraîne une forte augmentation du nombre de cellules Sox9^{High} mais n'affecte pas le nombre de cellules Sox9^{Low} (**Figure 42 A-C**). Par contre, les souris p57^{CK-}, présentent, un nombre de cellules Sox9^{Low} et Sox9^{High} similaire aux souris sauvages. Les cellules souches +4 sont normalement quiescentes (seulement 20% de ces cellules sont en prolifération) (Formeister et al., 2009; Li et al., 2016b; Van Landeghem et al., 2012). Afin de déterminer si l'augmentation du nombre de cellules souches Sox9^{High} résulte d'une augmentation de leur prolifération, un co-marquage Sox9/PCNA a été réalisé sur des coupes intestinales d'embryons p57^{WT}, p57^{KO} ou p57^{CK-}.

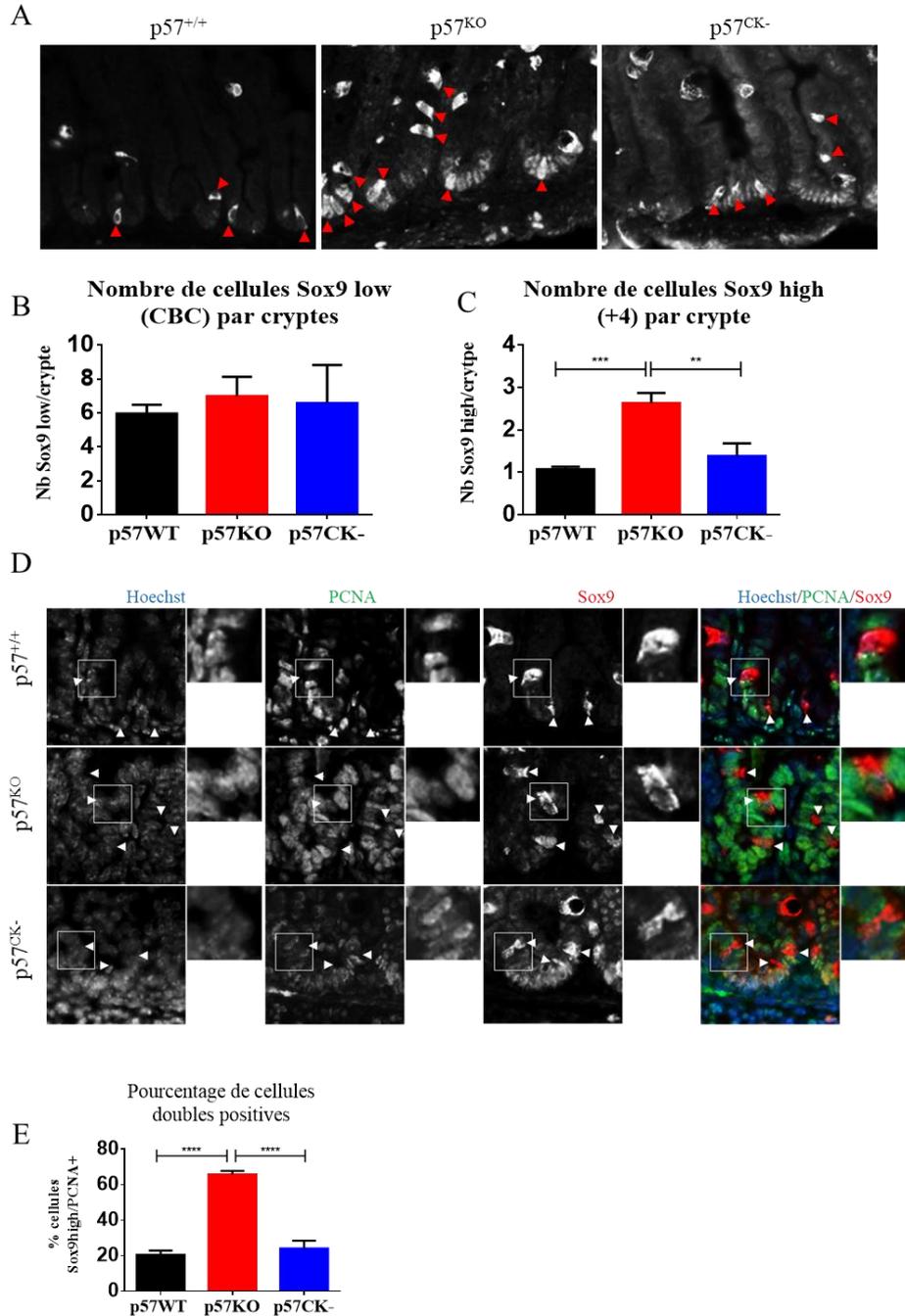


Figure 42: Dérégulation des cellules souches intestinales chez les souris p57^{KO}

(A) Immunohistomarquage de Sox9 sur des coupes intestinales d'embryon p57^{WT} (n=3), p57^{KO} (n=3) et p57^{CK-} (n=3) à E18.5. On distingue les CBC exprimant un faible niveau de Sox9 (Sox9^{Low}) et les cellules souches +4 exprimant un fort niveau de Sox9 (Sox9^{High}) (flèches rouges). (B-C) graphes représentant le nombre de cellules Sox9^{Low} (B) ou Sox9^{High} (C) par crypte en fonction du génotype de p57. (D) Co-marquage Sox9 et PCNA sur des coupes intestinales d'embryons p57^{WT} (n=3), p57^{KO} (n=3) et p57^{CK-} (n=3) à E18.5. Les cellules Sox9^{High} sont indiquées par une flèche blanche. (E) graphe représentant le pourcentage de cellules Sox9^{High} exprimant PCNA.

Les souris $p57^{KO}$ présentent une forte augmentation de la prolifération des cellules souches +4, environ 65% des cellules $Sox9^{High}$ expriment également PCNA, alors que chez les souris $p57^{WT}$ et $p57^{CK-}$ seulement environ 20% des cellules $Sox9^{High}$ sont positives pour PCNA (**Figure 42 D-E**), comme attendu ([Van Landeghem et al., 2012](#)). Ces résultats suggèrent donc que $p57$ est impliqué dans le maintien de la quiescence des cellules souches +4.

Cependant, l'expression de $Sox9$ dans la crypte intestinale n'est pas restreinte aux cellules souches, $Sox9$ est également exprimé dans les progéniteurs, ainsi que dans certaines cellules différenciées, ([Furuyama et al., 2011](#)), notamment les cellules entéroendocrines et les cellules de Tuft. Ces observations ont donc été confirmées par des expériences de traçage génétique.

1.3. Confirmation de la dérégulation des cellules souches en absence de $p57$

Les cellules souches CBC prolifératives sont identifiées par le marqueur $Lgr5$ ([Barker et al., 2007](#)). Les mutants $p57$ ($p57^{KO}$ ou $p57^{CK-}$) ont été croisés avec un modèle de souris reportrice $Lgr5-eGFP-IRES-creERT2$ (notées $p57^{KO};Lgr5^{eGFPcre-ERT}$ et $p57^{CK-};Lgr5^{eGFPcre-ERT}$, respectivement). Dans ce modèle murin, la GFP est placée sous le contrôle du locus $Lgr5$, ce qui permet par cytométrie en flux de distinguer une population GFP^{High} et une population GFP^{Low} représentant les CBC et leur descendants immédiats, respectivement. Les cellules GFP^{Neg} représentent les cellules différenciées ([Munoz et al., 2012](#) ; [van der Flier et al., 2009b](#)). L'analyse du pourcentage de cellules GFP^{High} n'a révélé aucun défaut des CBC chez les souris $p57^{KO}$ (0,17 +/- 0,04 % des cellules sont GFP^{High} contre 0,15 +/- 0,02 % chez les souris WT et 0,14 +/- 0,01 % chez les souris $p57^{CK-}$). Une augmentation des progéniteurs GFP^{Low} a été observée chez les animaux $p57^{KO}$ par rapport aux souris sauvages ou knock-in $p57^{CK-}$ (1,06 +/- 0,18 % de cellules GFP^{Low} chez les souris $p57^{KO}$, 0,58 +/- 0,05 % chez les souris WT et 0,48 +/- 0,13% chez les animaux $p57^{CK-}$) (**Figure 43 A-B**). De la même façon, le nombre de CBC par crypte a été évalué par analyses histologiques sur des coupes congelées, après immunomarquage contre la GFP, ce qui a permis de confirmer que le nombre de CBC n'est pas affecté par l'absence de $p57$ (**Figure 43 C-D**). Il n'est cependant pas possible d'évaluer la population GFP^{Low} par immunohistologie contre la GFP.

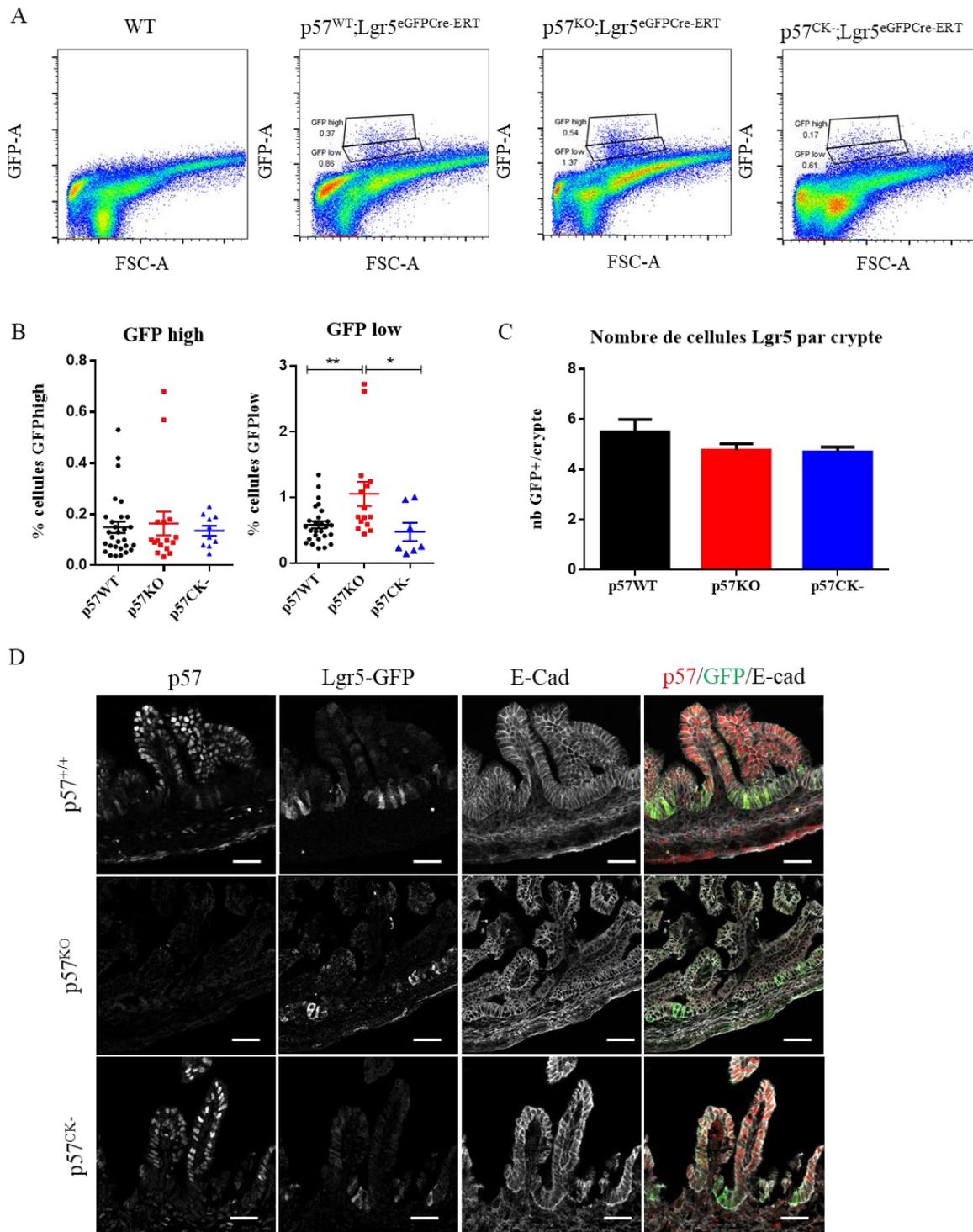


Figure 43 : L'absence de p57 n'affecte pas le nombre des CBC mais cause une augmentation du nombre de progéniteurs
 (A) Dot plot représentatifs de cytométrie en flux montrant l'expression de la GFP sur des intestins dissociés d'embryons WT, Lgr5GFP;p57^{WT} (n=29), Lgr5GFP;p57^{KO} (n=16) ou Lgr5;p57^{CK-} (n=10) à E18.5. Les chiffres indiquent les valeurs obtenues pour un individu. (B) Analyse quantitative du pourcentage de cellules GFP^{High} ou GFP^{Low} par cytométrie en flux en fonction du génotype de p57. (C) graphe représentant le nombre de cellules GFP positives évaluées par microscopie sur des coupes congelées. (D) Images confocales représentatives d'immunomarquages p57 et GFP sur des coupes intestinales d'embryons Lgr5^{GFP};p57^{WT} (n=5), Lgr5^{GFP};p57^{KO} (n=4) ou Lgr5^{GFP};p57^{CK-} (n=2) à E18.5. Barre d'échelle = 30 µm

Afin d'identifier les progéniteurs, un marquage Id1 a été réalisé, (Zhang et al., 2014) et a permis de confirmer l'augmentation du nombre de progéniteurs intestinaux chez les animaux $p57^{KO}$ (Figure 44 A-B). Cette augmentation n'est pas retrouvée chez les animaux $p57^{CK-}$.

Le nombre de CBC a été évalué par un marquage Olfm4, marqueur robuste des cellules souches (van der Flier et al., 2009a) pour lequel des anticorps fonctionnent en immunohistologie (Figure 44 C-D). En accord avec les analyses de cytométrie en flux et les marquages histologiques Sox9 et GFP, aucune différence significative du nombre de CBC n'est observée entre les animaux $p57^{WT}$, $p57^{KO}$ et $p57^{CK-}$.

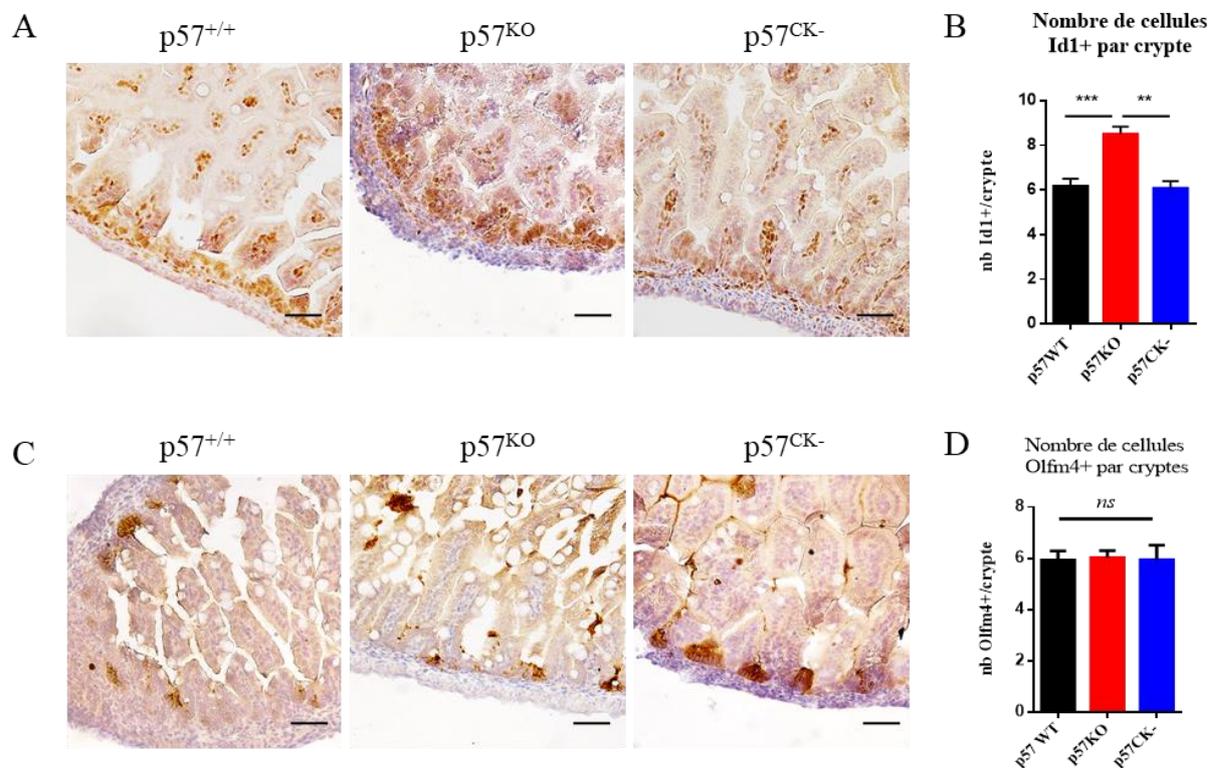


Figure 44 : Confirmation de l'augmentation des progéniteurs en absence de p57 par immunomarquage (A,C) Des coupes intestinales d'embryons $p57^{WT}$ (n=9), $p57^{KO}$ (n=6) ou $p57^{CK-}$ (n=5) à E18.5 ont été marquées par immunohistochimie contre Id1 (A) et Olfm4 (C) (marrons), barre d'échelle = 25 μ m. (B-D) Graphes représentant le nombre de cellules Id1⁺ (B) ou Olfm4⁺ (D) par crypte.

Ces résultats indiquent donc que p57 n'est pas requis pour le maintien des CBC, cependant son absence entraîne une augmentation du pool de progéniteurs et ce indépendamment de la perte d'inhibition des CDK.

Les cellules souches +4 sont identifiées par les marqueurs *Bmi1*, *mTert* et *Hopx* (Takeda et al., 2011). Afin de suivre les cellules souches +4, les souris $p57^{KO}$ ont été croisées avec des souris reportrices $Hopx^{3xFlagGFP}$ (notée $p57^{KO};Hopx^{3xFlagGFP}$). Comme précédemment, la proportion de cellules GFP a été évaluée par cytométrie en flux, ce qui a mis en évidence que la délétion de *p57* cause une augmentation du nombre de cellules souches $Hopx^+$ (0,33 +/- 0,04 % de cellules GFP chez les souris sauvages contre 0,88 +/- 0,23 % chez les souris $p57^{KO}$) (Figure 45 A-B). Le statut de prolifération de ces cellules $Hopx^+$ a ensuite été évalué. Un marquage GFP/*Ki67* sur des coupes congelées a permis de confirmer l'augmentation de prolifération de ces cellules souches de réserve en l'absence de *p57* (Figure 45 C-D). Afin d'évaluer le contenu en ADN des cellules $Hopx^+$ un marquage Hoechst a été réalisé sur cellules vivantes. Les résultats préliminaires indiquent une légère augmentation de la proportion de cellules 4n chez les animaux KO par rapport aux animaux WT (Figure 45 E), ce qui est cohérent avec l'augmentation de la prolifération observée. Ces expériences doivent être renouvelées avec un plus grand nombre d'animaux afin de confirmer cette augmentation. A cause de difficultés techniques, nous ne pouvons pas réaliser de marquage iodure de propidium ou BrdU après fixation des cellules. Une possibilité pour déterminer la distribution dans le cycle cellulaire de façon plus précise sur les cellules souches serait de trier les cellules GFP^+ puis de les fixer et marquer à l'iodure de propidium après le tri. Il est maintenant primordial de réaliser ces expériences avec les mutants $p57^{CK-}$ afin de confirmer de manière certaine que cette augmentation de la population $Hopx^+$ n'est pas due à une perte d'inhibition des CDK.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment donc les observations obtenues par le marquage *Sox9* qui indiquaient une amplification des cellules souches +4 ($Sox9^{High}$) en l'absence de *p57*, retrouvée dans les souris *Hopx*, alors que les CBC ($Sox9^{Low}$), n'étaient pas affectées, ce qui est confirmé dans les souris *Lgr5-eGFP-IRES-creERT2*. De plus, l'observation que les cellules $Sox9^{High}$ n'étaient plus quiescentes dans les souris $p57^{KO}$ est confirmée par le traçage des cellules $Hopx^+$, qui prolifèrent elles aussi en absence de *p57*. Une hypothèse attractive est qu'en absence de *p57*, les cellules souches +4 deviennent prolifératives, s'amplifient par division symétrique, expliquant l'augmentation du nombre de cellules $Hopx^+$, et génèrent des progéniteurs prolifératifs ($Id1^+$) par division asymétrique, qui à leur tour prolifèrent et causent la désorganisation tissulaire observée dans les intestins des souris $p57^{KO}$.

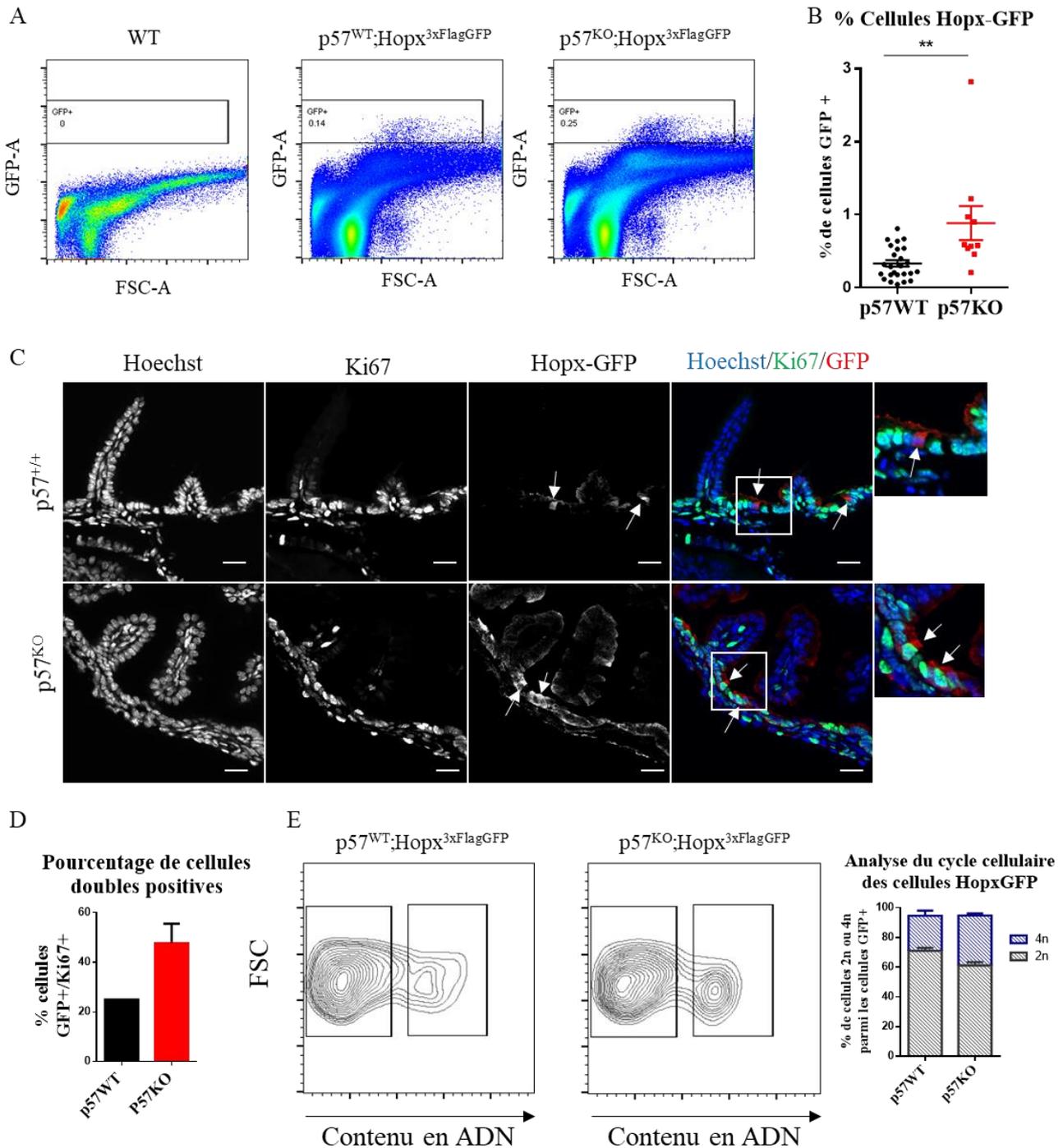


Figure 45 : L'absence de p57 entraîne une augmentation du nombre de cellules souches +4

(A) Dot plots représentatifs de cytométrie en flux montrant l'expression de la GFP sur intestin dissociés d'embryons $p57^{WT};Hopx^{3xFlagGFP}$ ($n=23$) et $p57^{KO};Hopx^{3xFlagGFP}$ ($n=10$) à E18.5. Les chiffres indiquent les valeurs obtenues pour un individu. (B) Analyse quantitative du pourcentage de cellules GFP par cytométrie en flux en fonction du génotype de p57. (C) Images confocales représentatives d'un co-marquage GFP/Ki67 réalisé sur des coupes intestinales congelées d'embryons $p57^{WT};Hopx^{3xFlagGFP}$ ($n=3$) et $p57^{KO};Hopx^{3xFlagGFP}$ ($n=3$) Barre d'échelle = 20 μ m. (D) Graphe représentant le pourcentage de cellules Hopx GFP⁺ exprimant Ki67 en fonction du génotype de p57. (E) Analyse du contenu en ADN des cellules Hopx⁺ par un marquage Hoechst des intestins dissociés d'embryons $p57^{WT};Hopx^{3xFlagGFP}$ ($n=4$), $p57^{KO};Hopx^{3xFlagGFP}$ ($n=3$) à E18.5. Plot représentatif du contenu en ADN des cellules GFP⁺ et graphe représentant l'analyse quantitative du pourcentage de cellules contenant 2n ou 4n d'ADN suivant le génotype p57.

1.4. p57 est fortement exprimé dans les cellules souches Hopx⁺

Sur les coupes histologiques, p57 apparaît comme étant exprimé dans les villosités (**Figure 43 D**). Afin de vérifier sa présence dans les cellules souches intestinales, l'expression de l'ARNm de p57 a été évaluée par RT-qPCR après tri cellulaire dans les différentes lignées reportrices (**Figure 46**). Dans un premier temps, la nature des différentes populations a été confirmée en évaluant l'expression de la signature génique des CBC et des cellules souches +4 (**Figure 46 A-B**).

Comme attendu, les cellules Lgr5-GFP^{High} présentent une forte expression des gènes signatures des CBC tels que Lgr5, Ascl2 et Olfm4 et une faible expression des marqueurs de cellules différenciées (Muc2, Muc4 et Sucrase). Comme décrit précédemment, (Munoz et al., 2012), nous avons détecté l'expression de certains marqueurs des cellules souches +4 comme mTert, Sox9, et Hopx. Les CBC Lgr5-GFP^{High} ainsi que les progéniteurs Lgr5-GFP^{Low} présentent une forte expression de Atoh1 (cible de la voie Notch, exprimé dans les progéniteurs sécréteur). Nous avons également détecté l'expression de Hes1 (effecteur de la voie Notch exprimé dans le lignage absorptif) dans les cellules Lgr5-GFP^{High} (Yang et al., 2001) (**Figure 46 A**). Concernant les cellules souches +4, nous avons observé l'expression de Hopx et de Mex3a, marqueurs des cellules souches quiescentes (Barriga et al., 2017; Takeda et al., 2011), comme attendu, ainsi qu'une expression modeste des gènes signatures des CBC, Lgr5 et Ascl2 par rapport aux cellules Hopx-GFP^{Neg} (**Figure 46 B**). Ces cellules souches de réserve présentent également une forte augmentation de Atoh1 ainsi qu'une diminution de l'expression de Hes1 et des gènes de différenciation. Cependant ces variations ne sont pas significatives (**Figure 46 B**).

Nous avons ensuite évalué l'expression de p57 dans les différentes populations cellulaires et nos résultats indiquent une diminution de l'expression de p57 dans les cellules Lgr5-GFP^{Low} et Lgr5-GFP^{High}, ce qui est cohérent avec l'absence de marquage p57 dans les cryptes en histologie (**Figure 43 D**). A contrario, nous avons observé une forte expression de l'ARNm de p57 dans les cellules souches Hopx⁺ (**Figure 46 C**). L'expression de p57 dans les cellules Mex3^{High} a également été mise en évidence récemment, ces cellules sont considérées comme des CBC quiescentes capables de se mobiliser en cas de régénération (Barriga et al., 2017). Le fort niveau d'expression de p57 observé est également cohérent avec le faible niveau de Hes1 dans les cellules Hopx⁺, puisque Hes1 a été montré comme étant un répresseur de l'expression de p57 dans la crypte intestinale (Riccio et al., 2008).

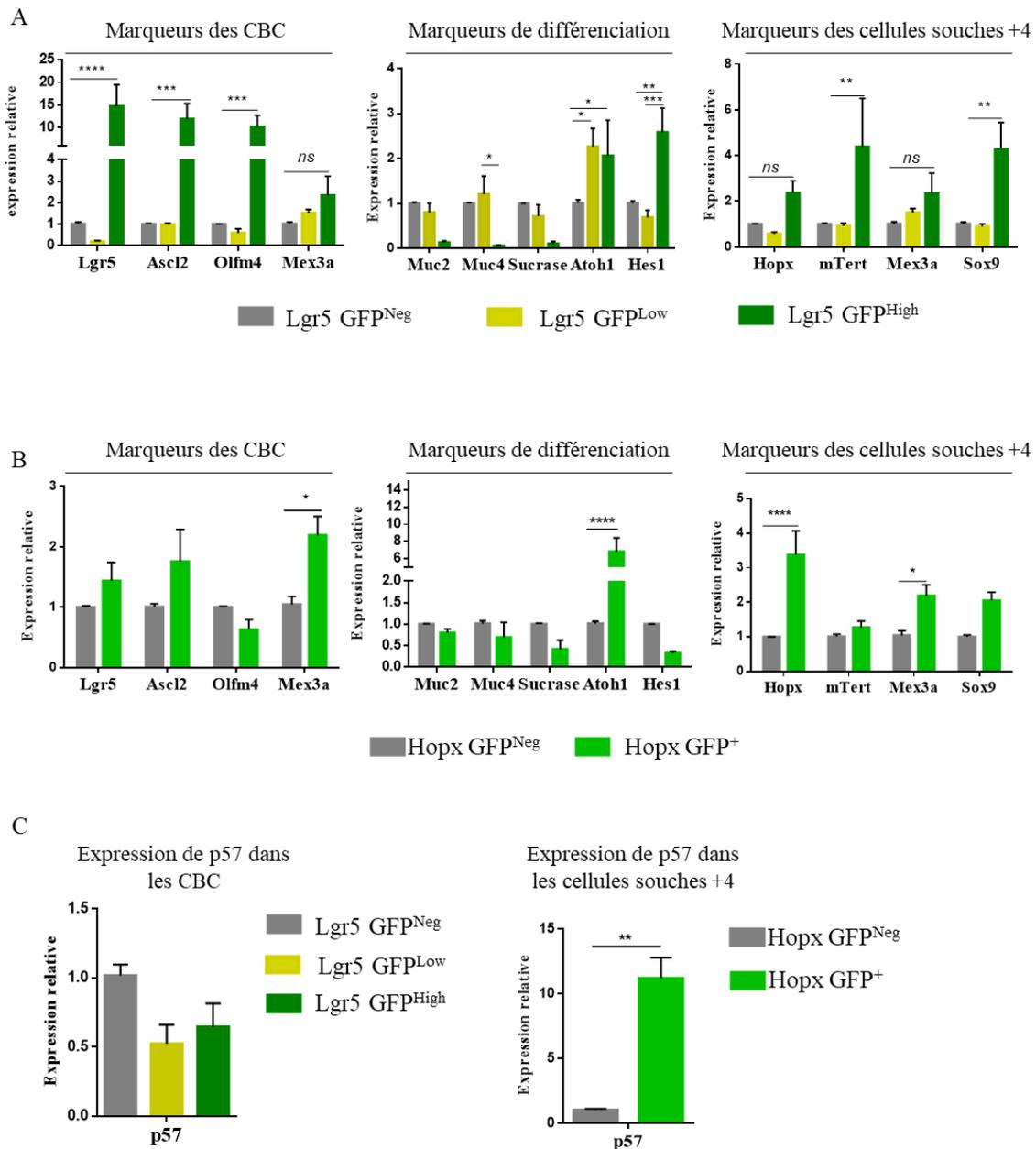


Figure 46 : p57 est exprimé dans les cellules souches +4

Des préparations de cryptes dissociées obtenues à partir de souris adultes $Lgr5^{eGFP^{Cre-ERT}}$ et $Hopx^{3xFlagGFP}$ ont été triées sur la base de l'expression de la GFP par cytométrie en flux. Le niveau d'expression de différents gènes souches et marqueurs de différenciation a été évalué par RT-qPCR sur ces populations triées. Les niveaux d'ARNm ont été normalisés par rapport à l'expression de GAPDH et sont exprimés en expression génique relative par rapport à la population GFP négative. (A) Expression relative des gènes marqueurs de CBC, de différenciation ou de cellules souches +4 dans les populations $Lgr5-GFP^{Neg}$, $Lgr5-GFP^{Low}$ et $Lgr5-GFP^{High}$ (n=3). (B) Expression relative des gènes marqueurs de CBC, de différenciation ou de cellules souches +4 dans les populations $Hopx-GFP^{Neg}$ et $Hopx-GFP^{+}$ (n=3). (C) Expression relative de l'ARNm de p57 dans les populations $Lgr5 GFP^{Low}$, $Lgr5-GFP^{High}$ et $Hopx-GFP^{+}$.

Ces résultats sont donc en accord avec la littérature et avec nos résultats précédents qui montrent une dérégulation des cellules souches +4 en absence de p57, sans affecter les CBC.

En résumé, ces expériences *in vivo* semblent indiquer que p57 est impliqué dans la maintenance de la quiescence des cellules souches intestinales +4 de manière indépendante de l'inhibition des CDK. La suite de ce projet a été de déterminer par quel mécanisme moléculaire p57 régule les cellules de la crypte intestinale.

2. Mécanisme moléculaire par lequel p57 contrôle la prolifération des cellules souches intestinales

Dans les cellules souches neurales, p57 module la différenciation via l'inhibition du facteur de transcription Ascl1. p57 interagit avec Ascl1, est présent au niveau de ses promoteurs cibles et inhibe son activité de manière indépendante des CDK (Joseph et al., 2009). De manière intéressante, le paralogue d'Ascl1, Ascl2, est l'un des facteurs de transcription clé dans la régulation des cellules souches intestinales. L'expression d'Ascl2 est dépendante de Wnt. Il est exprimé au niveau de la crypte et une augmentation de son expression entraîne une hyperprolifération alors que sa délétion cause une perte des cellules souches (van der Flier et al., 2009b). Ascl2 contrôle l'expression de nombreux gènes souches, notamment *Lgr5*, *Sox9* et *EphB3*. Wnt et Ascl2 agissent de manière synergique afin d'activer la transcription de ces gènes souches, il a également été montré que Ascl2 forme une boucle d'autorégulation positive et active sa propre transcription en présence de signaux Wnt (Schuijers et al., 2015). L'hypothèse que nous avons donc émise est que comme dans les cellules souche neurales, p57 est capable de moduler l'activité d'Ascl2 afin de contrôler les cellules de la crypte.

2.1. p57 interagit avec Ascl2 et inhibe son activité transcriptionnelle

L'interaction entre p57 et Ascl2 a été testée par co-immunoprécipitation après surexpression de Ascl2 et p57^{WT} ou p57^{CK-} dans des cellules HEK 293. Ces expériences indiquent que p57^{WT} et p57^{CK-} peuvent interagir avec Ascl2 (**Figure 47 A**). Cette interaction a été confirmée sur les protéines endogènes par des expériences de Proximity Ligation Assay (PLA) dans des cellules SW480 (lignée de cancer colorectale). Dans ces cellules, nos résultats indiquent que p57 est capable de lier Ascl2 (**Figure 47 B**).

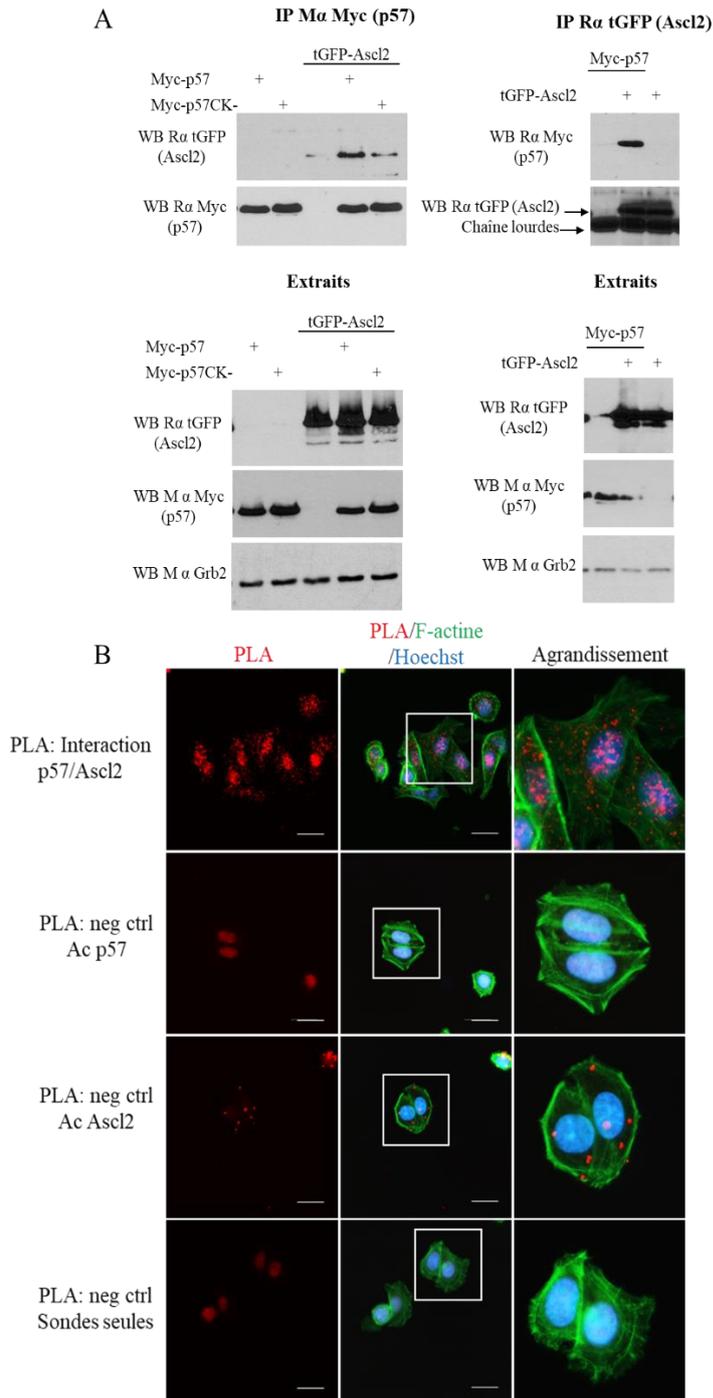
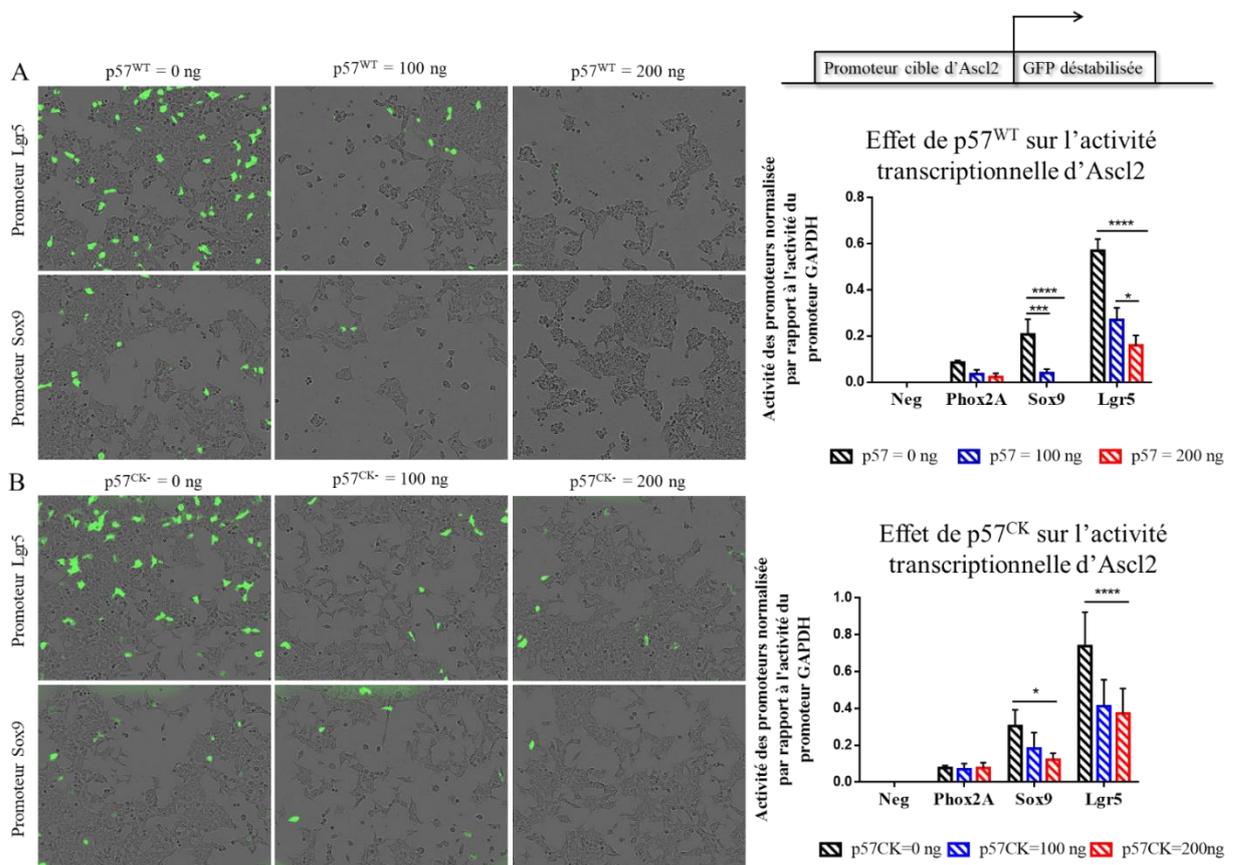


Figure 47 : p57 interagit avec Ascl2

(A) Ascl2-tGFP, p57^{WT}-Myc et p57^{CK-}-Myc ont été surexprimés dans des cellules HEK 293. p57^{WT} et p57^{CK-} ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-Myc et la présence d'Ascl2 a été visualisée par western blot avec un anticorps anti-tGFP. (B) Proximity Ligation Assay (PLA) sur cellules SW480 après 2 jours de culture. Les événements d'interaction entre p57 et Ascl2 sont visibles par des points rouges. Des contrôles négatifs avec les anticorps seuls ou les sondes seules ont été réalisés. La phalloïdine-FITC a été utilisée pour visualiser le contour des cellules. Barre d'échelle = 25 μ m. Les photos sont représentatives de 5 expériences indépendantes.

Afin de déterminer l'effet de p57 sur l'activité d'Ascl2, nous avons réalisé des expériences d'activité transcriptionnelle ou « transcription reporter assay », dans lesquelles une forme déstabilisée de la GFP (demi-vie \approx 1 h) placée sous le contrôle de promoteurs cible d'Ascl2 (Lgr5 et Sox9) est transfectée dans des HEK 293 en présence d'Ascl2 et de doses croissantes de p57. Le nombre de cellules GFP est ensuite suivi par microscopie (Incucyte), et les résultats sont normalisés par rapport à l'expression du promoteur GAPDH dans les mêmes conditions. On observe, que la transfection de quantité croissante de p57^{WT} ou p57^{CK-} entraîne une diminution de l'activité des promoteurs de Lgr5 et Sox9, traduisant une répression de l'activité transcriptionnelle d'Ascl2 (**Figure 48**).



L'ensemble de ces résultats indique donc que p57 interagit avec Ascl2 et inhibe son activité transcriptionnelle, et ce de manière indépendante des cycline/CDK.

2.2.p57 participe à la formation d'un complexe répresseur présent au niveau des promoteurs cibles d'Ascl2

L'interactome de p57 déterminé au sein de l'équipe en utilisant du p57 recombinant pour cribler des puces protéiques (9500 protéines), a permis d'identifier, parmi les 183 partenaires potentiels, de multiples régulateurs de la transcription dont l'histone déacétylase 7 (HDAC7) (Duquesnes et al., 2016). HDAC7 appartient à la famille des HDAC de classe II et réprime la transcription via la formation de complexes répresseurs notamment par son interaction avec la protéine échafaudage mSin3a (Kao et al., 2000).

L'interaction entre p57 et ce complexe co-répresseur HDAC7/mSin3a a donc été testée sur des protéines endogènes dans des SW480 par co-immunoprécipitation (**Figure 49 A**), ce qui a mis en évidence que p57, HDAC7 et mSin3a existent au sein d'un même complexe. Ces interactions ont été confirmées par PLA, toujours sur des protéines endogènes dans les cellules SW480, ces expériences de PLA ont permis de valider l'interaction entre p57/mSin3a et p57/HDAC7 (**Figure 49 B**). L'interaction entre Ascl2 et les membres de ce complexe co-répresseur a été vérifiée en expression endogène par PLA sur des SW480 (**Figure 50**). Enfin, nous avons également confirmé par co-immunoprécipitation que le mutant p57^{CK-} est également capable d'interagir avec mSin3a et HDAC7 dans un modèle de SW480 où le mutant p57^{CK-} a été surexprimé (**Figure 51**).

Afin d'investiguer si p57 participe à un complexe co-répresseur au niveau des promoteurs des gènes cibles d'Ascl2, nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Après immunoprécipitation avec des anticorps dirigés contre Ascl2, p57, HDAC7 et mSin3a, des qPCR pour différents promoteurs cibles d'Ascl2 ont été réalisées. Comme attendu, Ascl2 est présent sur les promoteurs de Lgr5, Sox9 et EphB3 (van der Flier et al., 2009b). Nous avons aussi mis en évidence que tous les membres du complexes co-répresseur précédemment identifié, p57, mSin3a et HDAC7, sont également présents au niveau de ces promoteurs cibles d'Ascl2 (**Figure 52**).

En conclusion, ces résultats suggèrent donc que p57 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'Ascl2 via la formation d'un complexe corépresseur avec HDAC7 et mSin3a.

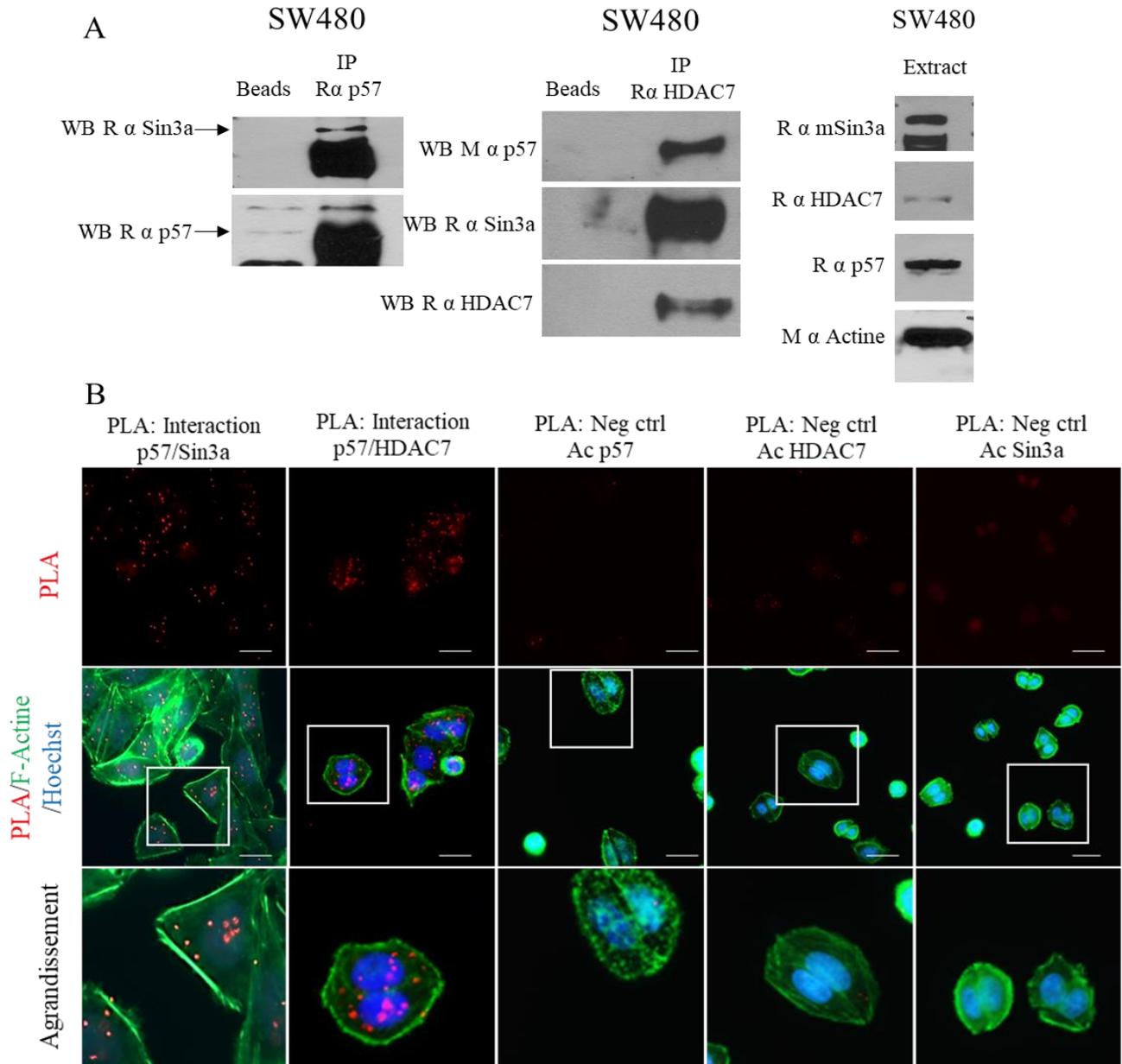


Figure 49 : p57 participe à la formation d'un complexe répresseur

(A) Co-immunoprécipitation de p57 avec HDAC7 et mSin3a endogènes dans des cellules SW480. p57 ou HDAC7 ont été immunoprécipités avec des anticorps anti-p57 ou anti-HDAC7 respectivement, des billes seules ont été utilisées comme contrôle négatif. Les protéines immunoprécipitées ont été détectées par immunoblots avec des anticorps anti-p57, anti-HDAC7 ou anti-mSin3a. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes. (B) PLA avec des anticorps p57 et HDAC7 ou p57 et mSin3a dans des cellules SW480 après 2 j de culture. Les événements d'interaction sont visibles par des points rouges (p57/mSin3a ou p57/HDAC7). Des contrôles négatifs avec chaque anticorps seul ont été réalisés. La phalloïdine-FITC a été utilisée pour visualiser le contour des cellules. Barre d'échelle = 25 μ m. Les données sont représentatives de 4 expériences indépendantes.

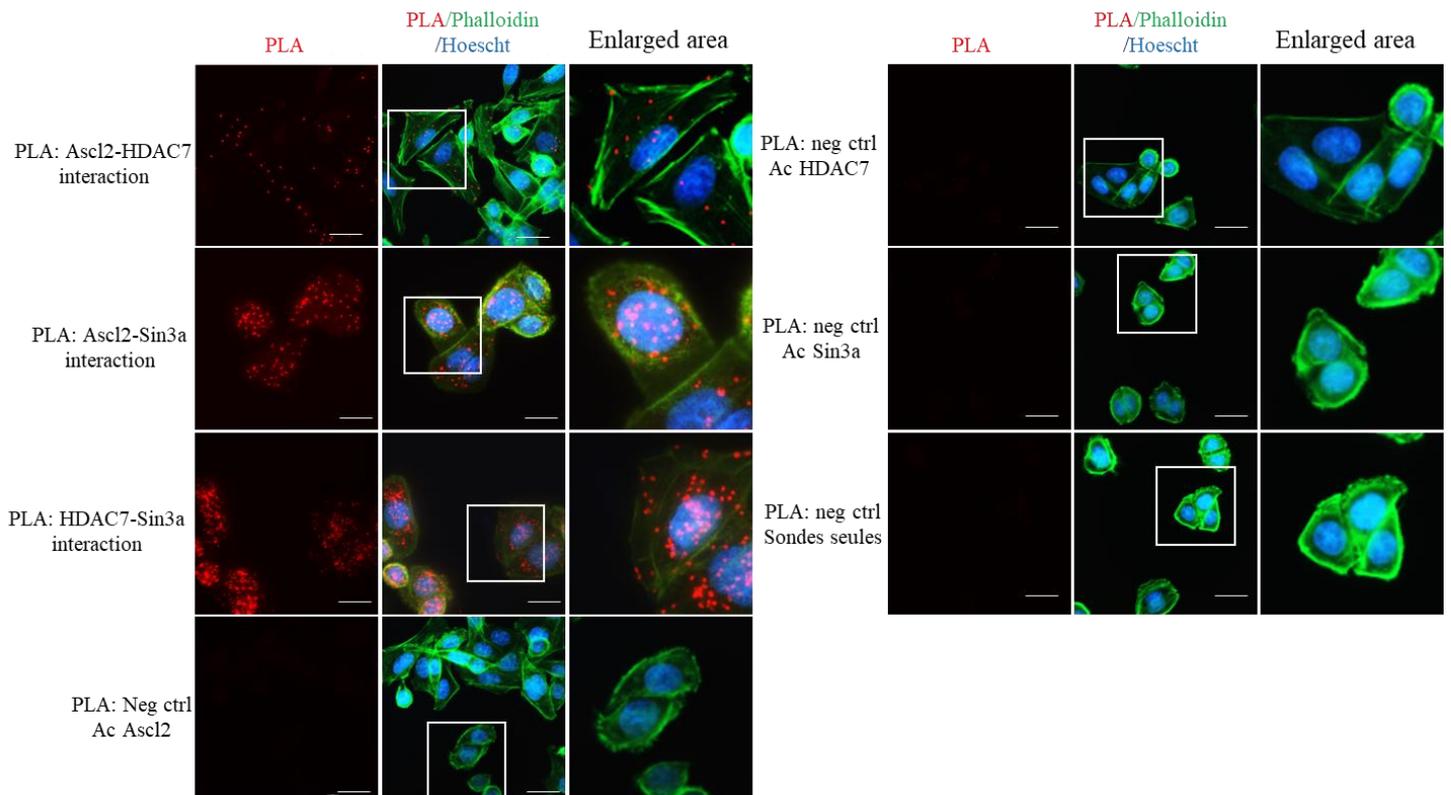


Figure 50 : Interaction entre Ascl2 et le complexe corépresseur

PLA sur cellules SW480 après 2 j de culture pour vérifier l'interaction entre HDAC7 ou mSin3a et Ascl2. Les événements d'interaction sont visibles par des points rouges (Ascl2/HDAC7, Ascl2/mSin3a et HDAC7/mSin3a). Des contrôles négatifs avec les anticorps seuls ou les sondes seules ont été réalisés. La phalloïdine-FITC a été utilisée pour visualiser le contour des cellules. Barre d'échelle = 25 μ m. Les données sont représentatives de 4 expériences indépendantes.

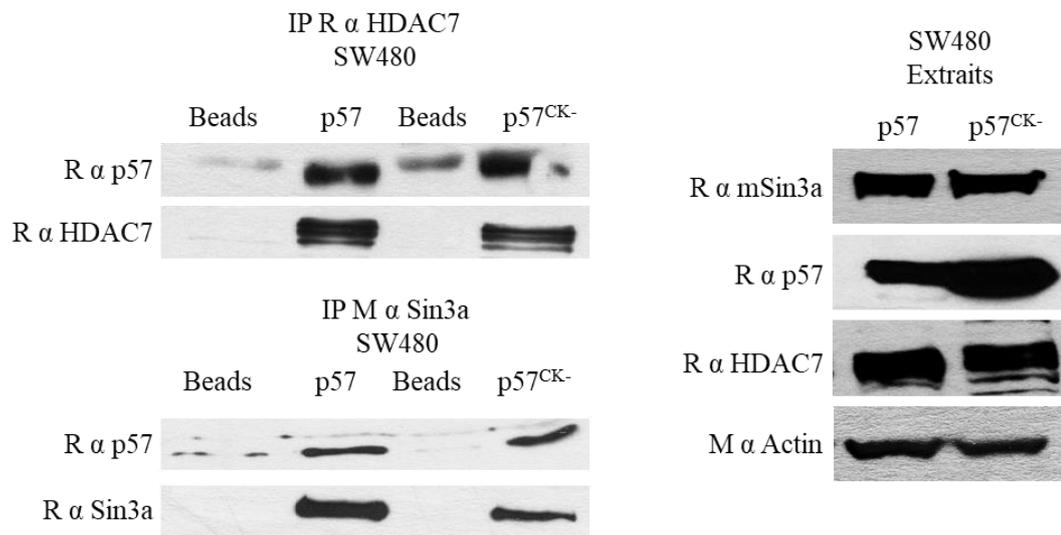


Figure 51 : p57^{CK-/-} peut interagir avec le complexe corépresseur

Co-immunoprécipitation de p57 ou p57^{CK-/-} avec HDAC7 ou mSin3a dans des cellules SW480 sauvages ou surexprimant le mutant p57^{CK-/-}. mSin3a ou HDAC7 ont été immunoprécipités avec des anticorps anti-mSin3a ou anti-HDAC7 respectivement, des billes seules ont été utilisées comme contrôle négatif. Les protéines immunoprécipitées ont été détectées par immunoblots avec des anticorps anti-p57, anti-HDAC7 ou anti-mSin3a. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

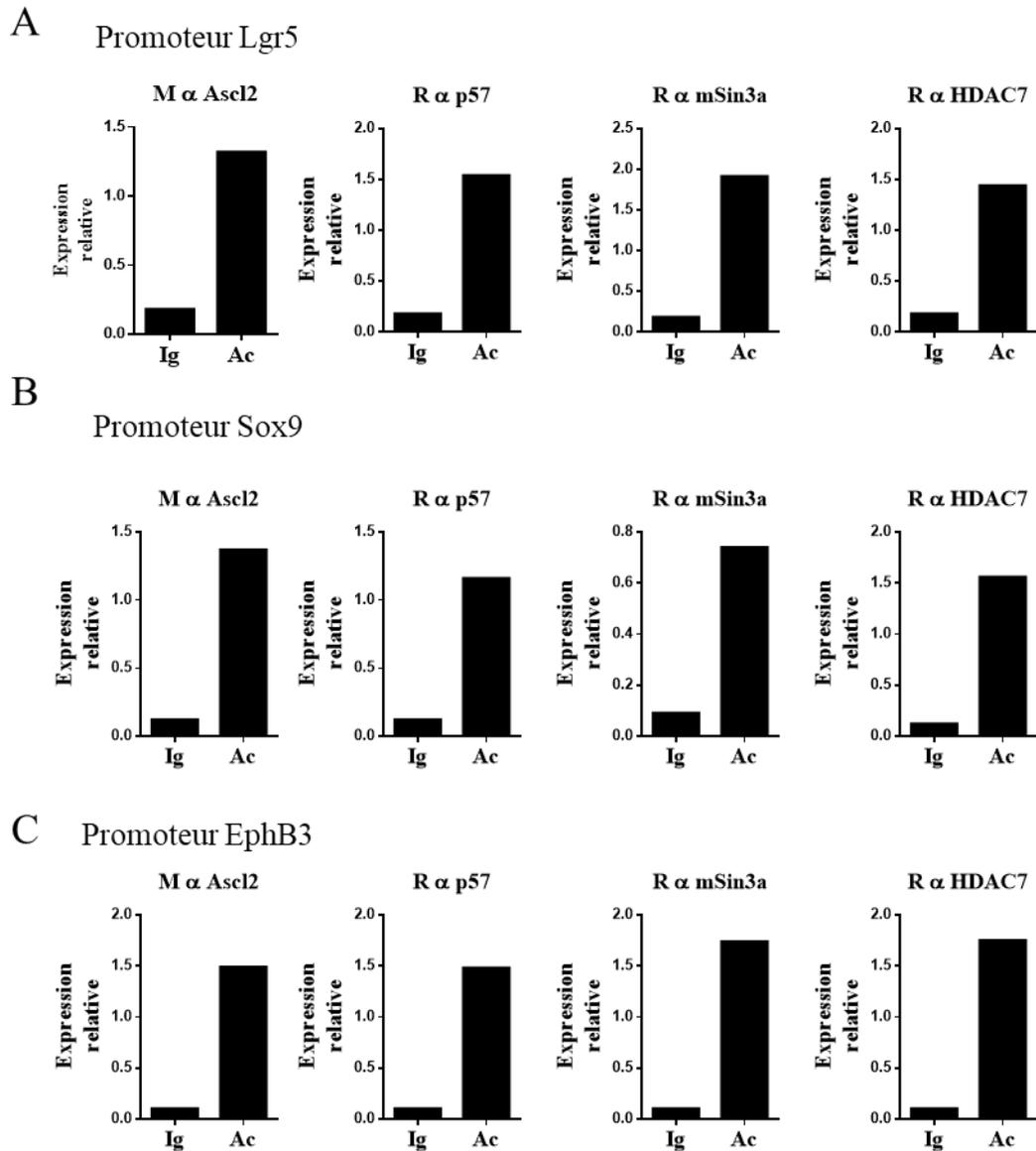


Figure 52 : Le complexe corépresseur est présent sur les promoteurs cibles d'Ascl2

Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont été réalisées pour déterminer la présence du complexe co-répresseur sur les promoteurs des gènes cibles d'Ascl2. Après immunoprécipitation de l'ADN avec les différents anticorps (p57, Ascl2, HDAC7, mSin3a ou isotype contrôle) des qPCR ont été réalisées avec des amorces spécifiques des promoteurs cibles d'Ascl2 : Lgr5 (A), Sox9 (B) et EphB3 (C). Les graphes montrent les données d'une expérience représentative d'au moins 3 expériences.

Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence que p57 joue un rôle essentiel dans le développement intestinal de manière indépendante de l'inhibition des CDK. En effet, les animaux $p57^{KO}$ présentent un raccourcissement de l'intestin et une hyperprolifération de la crypte. Nous avons pu mettre en évidence que les animaux $p57^{KO}$ présentent une augmentation du nombre de cellules souches +4, qui normalement expriment fortement p57, ainsi qu'une augmentation du pool de progéniteurs. Le mécanisme moléculaire que nous proposons pour expliquer cette dérégulation est que p57 est capable de lier et d'inhiber l'activité transcriptionnelle d'Ascl2 via la formation d'un complexe répresseur avec mSin3a et HDAC7. La perte de p57 entraînerait donc la dérégulation d'Ascl2 et la conversion des cellules souches +4 en une population plus proche des CBC prolifératives, résultant ainsi en une augmentation du nombre de cellules souches +4 et du nombre de progéniteurs. Il reste néanmoins certains points à éclaircir concernant ce mécanisme moléculaire.

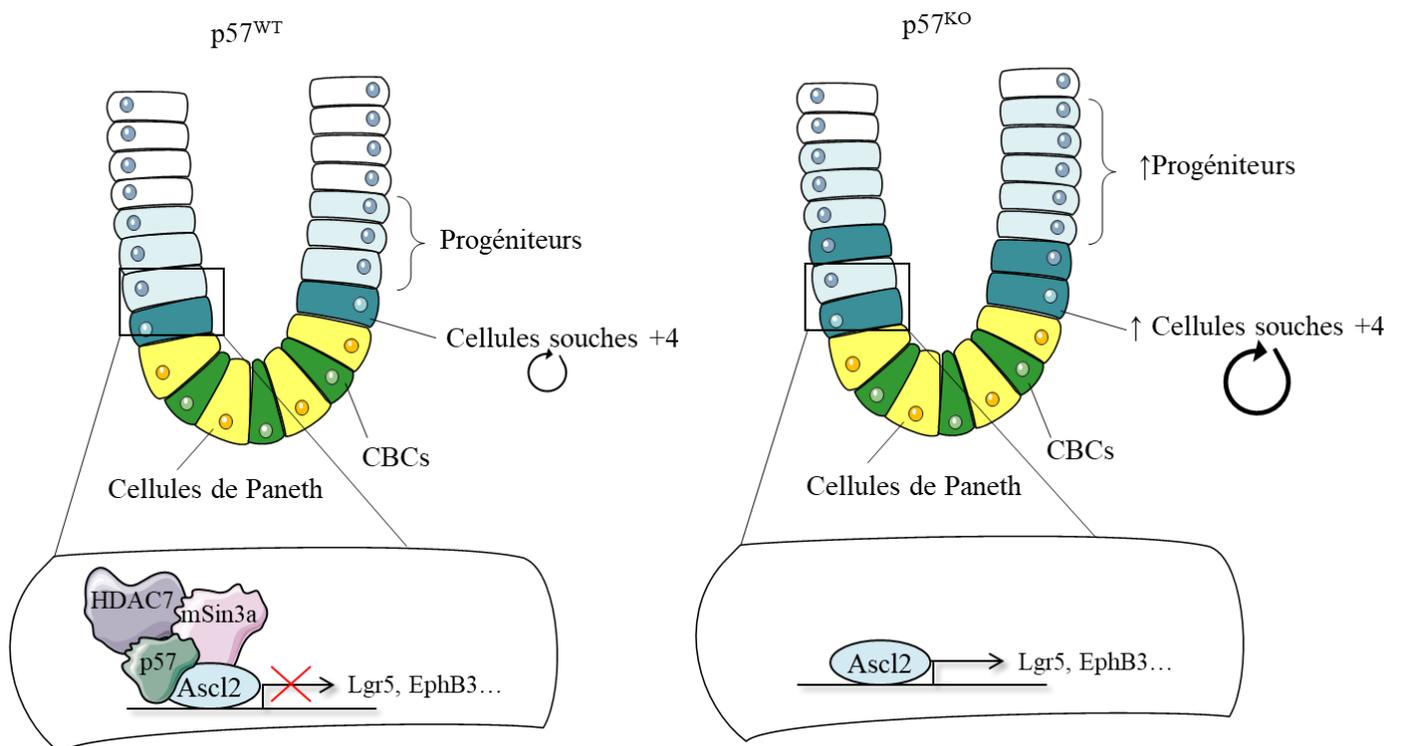


Figure 53 : Modèle proposé pour la régulation des cryptes intestinales par p57

II. 2^{ème} objectif : Développement d'un modèle 3D d'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal présente une topographie et une organisation caractéristique en cryptes et villosités avec les cellules souches et progéniteurs prolifératifs localisés au niveau des cryptes et les cellules différenciées migrant vers le haut des villosités. L'autorenouveauement des cellules souches et la différenciation des progéniteurs sont soutenus par le microenvironnement qui varie le long de l'axe crypte/villosité avec la présence de gradient de facteurs de croissance et de matrices extracellulaires. Des signaux supplémentaires fournis par les autres types cellulaires de la niche sont également important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

L'objectif de ce projet a été de développer un modèle de culture en 3 dimensions reproduisant la topographie de l'épithélium intestinal. Dans un premier temps, nous avons développé un nouveau matériau photosensible compatible avec la culture cellulaire composé d'un mélange de PEG-DA/acide acrylique en présence de matrice extracellulaire. Cet hydrogel a ensuite été imprimé en 3 dimensions par une technique de stéréolithographie haute résolution afin de fabriquer des scaffolds de culture reproduisant la topographie et les dimensions de l'épithélium intestinal murin. Enfin, nous avons montré que ces scaffolds 3D supportent la culture de cellules de cancer colorectal Caco-2 jusqu'à 21 jours et permettent la formation d'un épithélium polarisé en 3 dimensions.

Ces systèmes de cultures en 3D peuvent constituer une approche complémentaire aux organoïdes afin d'étudier les cellules souches et leur descendance *in vitro*. Ce modèle microfabriqué représente également une alternative intéressante aux tests animaux pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Les résultats de ce projet sont présentés dans le manuscrit suivant publié dans le journal *Biomaterials*.



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography



Justine Creff^{a,b}, Rémi Courson^b, Thomas Mangeat^a, Julie Foncy^b, Sandrine Souleille^b,
C. Thibault^{b,c}, Arnaud Besson^{a,*}, Laurent Malaquin^{b,*}

^aLBCMCP, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31062, Toulouse Cedex, France

^bLAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, F-31400, Toulouse, France

^cUniversité de Toulouse, Institut National des Sciences Appliquées—INSA, F-31400 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Keywords:
3D printing
Scaffold
Intestine
Crypt
Villus
Hydrogel

ABSTRACT

The small intestine is a complex tissue with a crypt/villus architecture and high tissue polarity. Maintenance of tissue integrity and function is supported by a constant renewal of the epithelium, with proliferative cells located in the crypts and differentiated cells migrating upward to the top of villi. So far, most *in vitro* studies have been limited to 2D surfaces or 3D organoid cultures that do not fully recapitulate the tissue 3D architecture, micro-environment and cell compartmentalization found *in vivo*. Here, we report the development of a 3D model that reproduces more faithfully the architecture of the intestinal epithelium *in vitro*. We developed a new fabrication process combining a photopolymerizable hydrogel that supports the growth of intestinal cell lines with high-resolution stereolithography 3D printing. This approach offers the possibility to create artificial 3D scaffolds matching the dimensions and architecture of mouse intestinal crypts and villi. We demonstrate that these 3D culture models support the growth and differentiation of Caco-2 cells for 3 weeks. These models may constitute a complementary approach to organoid cultures to study intestinal homeostasis by allowing guided self-organization and controlled differentiation, as well as for *in vitro* drug screening and testing.

1. Introduction

The primary function of the intestinal tract is the digestion and absorption of nutrients. To maintain optimal function and tissue integrity, the intestinal epithelium is constantly renewed. The epithelium of the small intestine is organized into a large number of “crypt-villus” units. Villi are finger-like structures covered by a simple epithelium of differentiated cells projecting into the intestinal lumen to maximize nutrient absorption. The base of each villus is surrounded by several invaginations, called crypts of Lieberkühn. The constant renewal of the epithelium is driven by intestinal stem cells (ISCs) that reside at the crypt base [1–3]. ISCs proliferate and produce progenitors, called transit-amplifying cells, localized just above the stem cell zone in the crypt. These progenitors undergo several rounds of division and migrate along the crypt-villus axis while they terminally differentiate into different cell types, including enteroendocrine, tufts and goblet cells, and enterocytes [1,3,4]. Stem cell self-renewal and progenitor

differentiation are supported by the crypt microenvironment, or niche. This microenvironment changes along the crypt-villus axis and determines the balance between proliferative and differentiation signals [3]. For instance, the Wnt, Notch and Noggin growth factors are present in decreasing gradients from the crypt bottom [5,6]. Additional signals provided by the extracellular matrix (ECM), microbiota and immune cells are also important for ISC maintenance and progenitor differentiation [3,7]. Despite numerous studies, the exact mechanisms governing intestinal homeostasis remain poorly understood, possibly due to the lack of *in vitro* models to grow and study ISCs and their progeny.

Recent progress in stem cell technology has allowed developing three-dimensional (3D) cultures from primary mouse and human adult ISCs [8–10]. In these cultures, cells self-organize into intestinal organoids exhibiting self-renewing crypt compartments, with proliferative cells that differentiate to give flat “villi-like” domains. While these 3D systems recapitulate the heterogeneity of the intestinal tissue *in vitro*, they present several limitations, notably their spherical architecture

* Corresponding author. LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, INSA, Toulouse, 7 avenue du Colonel Roche 31031 Toulouse Cedex 4, BP 54200, France.

** Corresponding author. LBCMCP UMR5088 CNRS, Université Paul Sabatier-Toulouse III, Centre de Biologie Intégrative, CBI FR3743 118 route de Narbonne, 31062, Toulouse cedex 9, France.

E-mail addresses: arnaud.besson@univ-tlse3.fr (A. Besson), laurent.malaquin@laas.fr (L. Malaquin).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119404>

Received 27 March 2019; Received in revised form 26 July 2019; Accepted 1 August 2019

Available online 05 August 2019

0142-9612/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

and lack of lumen. Moreover, these structures cannot support the formation of signaling gradients and mechanical forces, and therefore do not fully recreate the native microenvironment [11].

To address these limitations, several studies reported the development of new engineered culture systems to study the intestinal epithelium [12]. In particular, recent advances in microfabrication technologies and biomaterials made possible the development of new 3D *in vitro* systems more physiologically relevant to study the intestinal epithelium [11,13,14]. Most of these systems use Caco-2 cells as tissue mimic. Caco-2 are human colorectal adenocarcinoma cells that spontaneously differentiate into a polarized epithelium exhibiting characteristics similar to small intestine enterocytes upon reaching confluence [15]. In order to recreate the architecture of the intestinal epithelium, various 3D micro-patterned scaffolds mimicking intestinal villi [16–21] or crypts [22] have been developed, mostly using molding or lithography technologies.

These studies have clearly demonstrated the interplay between cell differentiation, polarization and 3D microenvironment. Recently, a 3D model reproducing the crypt/villi architecture and biochemical gradients using micro-molded cross-linked collagen was developed to culture primary human intestinal cells [23,24]. This model has shown that 3D topology, in addition to other physical and chemical cues, is a key factor to promote cell differentiation and polarization. However, due to limitations in the resolution and/or complexity of the fabrication techniques, many of these 3D models still fail to fully recapitulate or accurately control the topology of crypt/villi compartments. In this work, we investigated the capabilities of 3D printing to improve the resolution and complexity of topographies accessible for scaffold fabrication compared to molding technologies. Recent advances in additive manufacturing technologies such as extrusion printing, inkjet printing or laser assisted printing now allow printing biocompatible materials with full flexibility on the design and shape. An attractive method for bioprinting is stereolithography (SLA) that uses a light-induced polymerization process [25,26]. This approach offers the possibility to rapidly create complex objects at high resolution using a large range of photosensitive materials including rigid photoresists or synthetic hydrogels [27,28]. This technology has been used for cell culture, either for the fabrication of scaffolds or for direct printing of cells encapsulated in ECM [29,30]. However, most of the approaches reported so far are still limited by the resolution of the printing technologies, typically above 50 μm . Two-photons based techniques may offer a resolution in the sub-micrometer range but are still strongly limited by the printing speed and by the maximum sample volume that is accessible. We recently reported a new 3D SLA printing technology that compensates for these limitations [31]. It combines a resolution of 5 μm in x, y and z and the possibility to print large objects (maximum 10(x) x 10(y) x 5(z) cm^3). This resolution enables to print scaffolds mimicking the architecture and dimensions of the intestinal epithelium.

The choice of the material used to create the scaffold is critical. To improve biocompatibility and relevance for bioengineered systems, various materials have been investigated, such as Polydimethylsiloxane (PDMS), SU-8 epoxy resin, collagen, or silk [16,17,19–22]. While natural materials are very effective to support cell growth and differentiation, they are often not completely defined and contain animal-derived products that preclude clinical applications. Moreover, ECM such as collagen are mostly biodegradable and the 3D topography is not conserved in long-term cultures [18]. A common alternative for tissue engineering is the use of synthetic polymers such as poly(ethylene) glycol diacrylate (PEG-DA) or polyacrylamide [32,33]. These synthetic hydrogels are more controllable and offer more flexibility to control mechanical and chemical properties in a reproducible manner. Moreover, these materials are compatible with 2D/3D fabrication through photolithography based approaches [30,34,35]. Beyond their reproducibility, another advantage of synthetic materials is the possibility to modify them, allowing their tuning with degradation and/or adhesion sites or even growth factors [32,36–38]. For instance, to support

cell growth and colonization, adhesion ligands such as RGD peptides or laminin can be grafted to the hydrogel [39]. Synthetic hydrogels based on poly(ethylene)glycol polymer (such as PEG-4MAL or 8 arm-PEG4) have been used to replace Matrigel in 3D intestinal organoid cultures to improve the control and reproducibility over matrix physicochemical properties [40,41]. Here, we developed a novel photosensitive biomaterial based on an intricate network composed of PEG-DA and acrylic acid polymer chains that allows cell adhesion and proliferation. Whereas many material formulations may require complex synthesis or numerous functionalization steps, this material is simple to prepare and can be functionalized easily with ECM proteins to improve cell attachment and proliferation. Moreover, it combines a high optical transparency for microscopy imaging with tunable stiffness properties. Using high-resolution stereolithography technology, we 3D printed this material with a micrometric resolution and successfully reproduced the topography and dimensions of the different compartments of the mouse intestinal epithelium. Finally, we showed that this culture system supports the growth of Caco-2 cells and allows the formation of a polarized and differentiated epithelium in three dimensions.

2. Experimental section

2.1. Cell culture

Caco-2 cells were cultivated in DMEM 4.5 g/L glucose (Sigma, D6429) supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies, 10270106), 0.1 mM non-essential amino acids (Sigma, M7145) and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin/streptomycin (Sigma, P4333). SW480 cells were cultivated in RPMI 2 g/L glucose (Sigma, R8758) supplemented with 10% FBS, 0.1 mM non-essential amino acids, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin/streptomycin and 2.5 g/L D-Glucose (Sigma, G7021). All cells were grown at 37 °C and 5% CO_2 . For cell culture on 2D hydrogels, Caco-2 or SW480 cells were seeded at a density of 20,000 cells. cm^{-2} and grown for 6 days with medium changes every 2–3 days. For 3D cultures or control 2D cultures, Caco-2 cells were plated at a density of 75,000 cells. cm^{-2} in conditioned media (culture supernatant) and kept in culture for up to 3 weeks with medium changed every 2–3 days.

2.2. Hydrogel preparation

Hydrogels were prepared as described previously [42]. The photoinitiator Phenylbis(2,4,6-trimethyl-benzoyl)phosphine oxide (Irgacure 819, Sigma, 511447) was dissolved at 0.1% (wt/vol) in PEG-DA MW 700 (Sigma, 455008). To prepare hydrogels, the different components were mixed in a conical tube: PEG-DA 700 (30–60%) (vol/vol) containing the photoinitiator, 30% acrylic acid (Sigma, 147230) (vol/vol) supplemented or not with either 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronectin (Corning, 356008), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ laminin (Sigma, L2020) or 1% collagen-1 (Sigma, C4243), the volume was then completed with culture medium (10–40%) (vol/vol). Ultraviolet crosslinking was performed using a UV lamp (365 nm, 12 W) or the Dilase 3D printer (Kloé, France). Polymerized hydrogels were washed overnight in culture medium prior to cell seeding.

2.3. 3D printing of intestinal scaffold

Intestinal scaffolds were printed by stereolithography with a Multiresolution Dilase 3D setup (Kloé SA, France) (Fig. 1). This equipment and its performances have been described in our previous work [31]. STL file, made with CAO 3D software, was sliced using the 3D slicer software (Kloé). The first 200 μm (crypt part) were sliced in 50 μm thick layers (four layers) and printed with a 5 μm spot size, while villi were sliced in 20 μm layers (35 layers) and printed with a 20 μm spot size. The total dimensions of the sample were 4 x 4 x 0.7 mm^3 for 500 μm high villi and 4 x 4 x 1.7 mm^3 for 1500 μm high villi (Fig. 3). To ensure adhesion of the PEG-DA hydrogel during the 3D printing

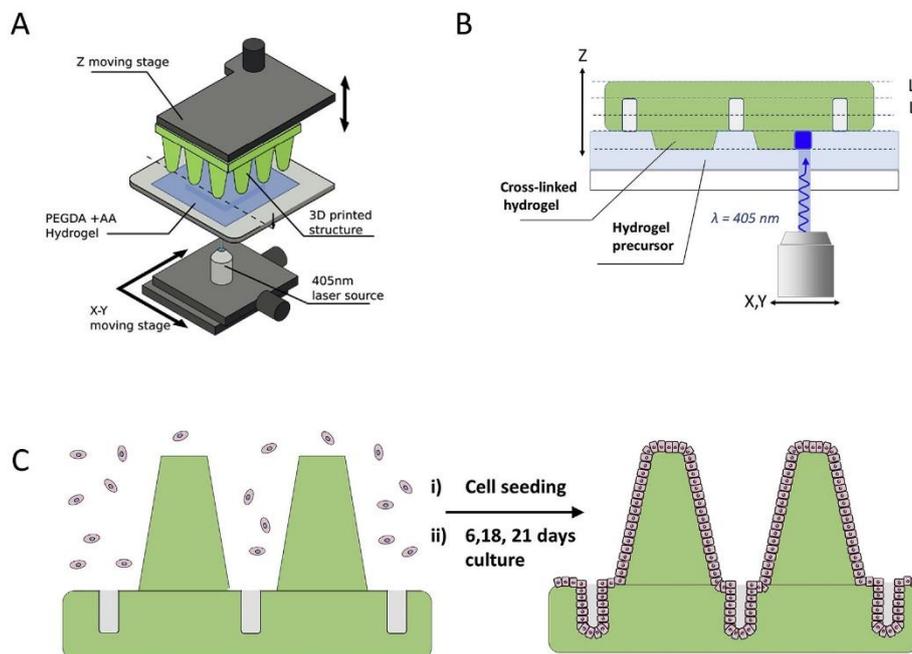


Fig. 1. Schematic of the experimental strategy. 3D intestinal scaffolds were printed using a Dilase 3D high-resolution printer. The object is printed layer by layer of 20–50 μm using a 405 nm laser (A–B). Scaffolds were then seeded with colorectal cancer cells that were grown for up to 21 days (C).

process, a DS-3000 (DWS, Italy) substrate of $1 \times 1 \times 0.05 \text{ cm}^3$ was prepared by 3D printing using DWS 29 J + or B9 creator® systems. Indeed, just after the development step, the DS-3000 surface (last printed layer) is still reactive because of the uncrosslinked polymer chains that was in contact with the PDMS in the printer vat [31]. Consequently, PEG-DA can create covalent bonds with pending acrylate functions on the DS-3000 surface. Regarding the parameters employed for the production of the 3D scaffold, a pedestal of 50 μm was first fabricated with 100% laser power and 15 mm/s writing speed. This pedestal allowed a strong adhesion on substrate and ensured parallelism between the substrate and the top of the tank. Then, a laser power of 100% and a writing speed of 20 mm/s were set to fabricate the rest of the scaffold. Total fabrication time of the structure was 12 h. After laser writing, the sample was removed from the building table and developed by two successive water baths, the sample was kept in water to prevent dehydration and deformation of the structure. Before cell seeding, 3D scaffolds were sterilized using UV light (365 nm, 12 W) for 20 min and washed 3 times with culture medium.

2.4. Immunofluorescence

Cells were rinsed with PBS and fixed with 2% PFA for 20 min at 37 °C. Cells were permeabilized using PBS-0.2% Triton X-100 for 3 min. After three 5 min washes in PBS, cells were incubated with primary antibodies diluted in PBS + 3% BSA + 0.05% Tween 20 + 0.08% sodium azide for 1 h at 37 °C or with phalloïdin conjugated to FITC or rhodamine (Interchim) at 1/500 for 30 min at 37 °C. Primary antibodies used for immunofluorescence were: Mouse anti Pan-cytokeratin (Cell signaling, C11 #4545 [1/100]), Goat anti Villin (Santa Cruz Biotechnology, C-19, sc-7672 [1/50]) and Mouse anti β -catenin (BD Biosciences #610153 [1/200]). After three 5 min washes in PBS, cells were incubated for 30 min at 37 °C with Cy2-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) at 1/400 dilution. For F-actin co-staining, phalloïdin was added to secondary antibody solution. Cells

were then rinsed three times 5 min in PBS, with the first wash containing Hoechst 33342 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) at 1/1000 for nuclear DNA staining.

2.5. Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase activity was assessed with Blue Alkaline Phosphatase (Blue AP) Substrate kit (Vector Laboratories, SK-5300), according to the manufacturer's protocol. Briefly, living cells were rinsed with PBS and incubated for 30 min at 37 °C with Blue AP substrate in Tris Buffer (150 mM, pH 8.4), rinsed with PBS and fixed with 4% PFA for 20 min at 37 °C.

2.6. Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM measurements were performed using Borosilicate Glass Particle (10 μm) on silicon nitride cantilevers (PT.BORO.SN.10, Novascan Technologies) with a nominal spring constant of 0.06 N/m mounted on a NanoWizard III AFM (JPK Instruments) coupled to an inverted optical microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss). To ensure reproducibility in force application and measurement, the cantilever sensitivity and spring constant were calibrated before each experiment using the JPK Instrument software using the thermal noise method. Force-distance curves were recorded in contact mode in liquid at 2 Hz (1 s per approach-retract force curve) with an applied force of 1 nN. Each hydrogel was tested at 4 locations with about 250 force curves acquired per location and 512 data points per curve.

Surface topography imaging was performed by AFM using a MLCT cantilever (Bruker) with a nominal spring constant of 0.07 N/m on a NanoWizard III AFM (JPK Instrument). Imaging of the 3D scaffold was done at the top of the villi.

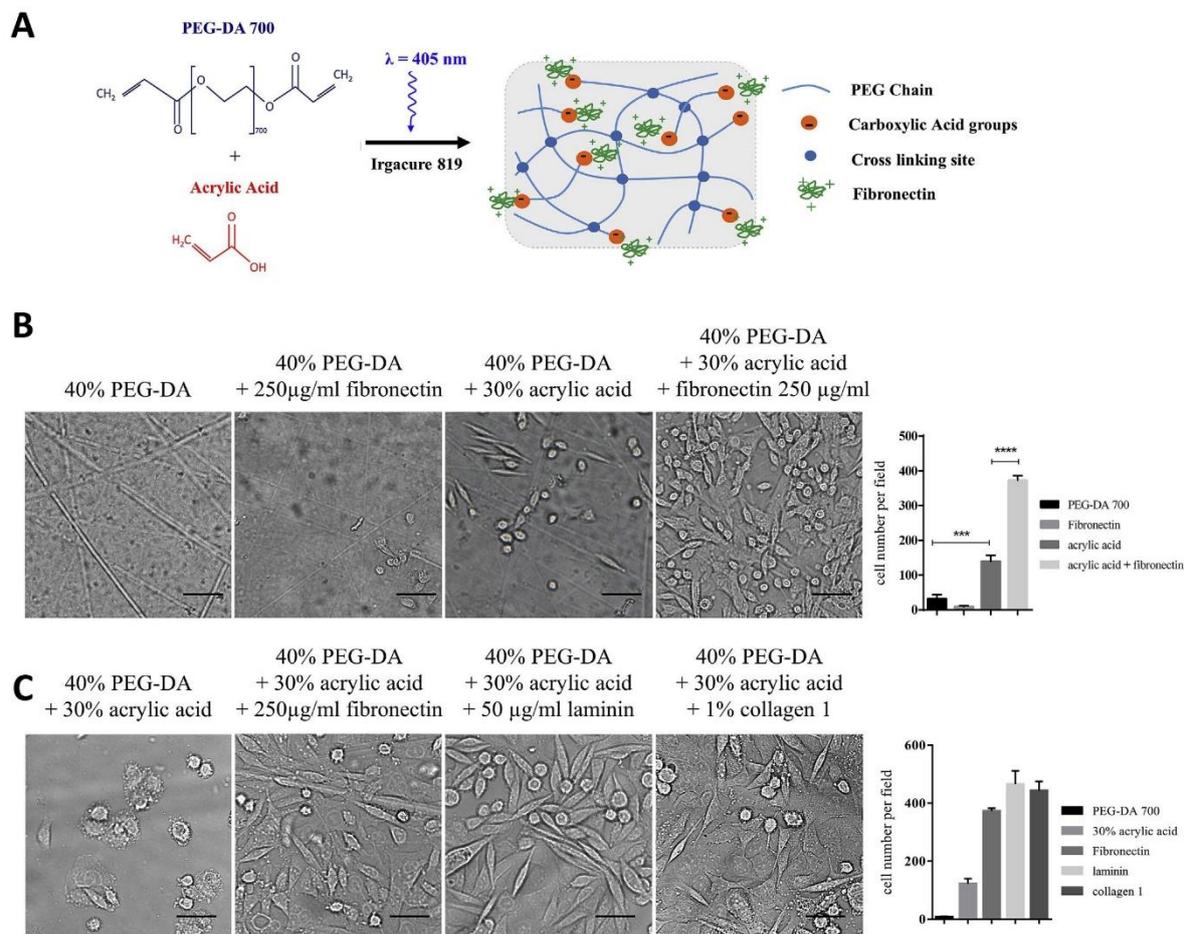


Fig. 2. Development of a new photosensitive hydrogel for tissue culture. **A.** A mixture consisting of 40% PEG-DA 700 (v/v) and 30% acrylic acid (v/v) and Fibronectin in presence of Irgacure 819 was polymerized with UV light to form a hydrogel. **B.** Representative phase-contrast images of SW480 cells grown for 6 days on PEG-DA hydrogels containing or not acrylic acid and/or fibronectin. The bar graph shows the number of adherent cells per field (4 fields with a 20x objective counted from three independent experiments). **C.** Representative phase-contrast images of SW480 grown for 6 days on hydrogels containing different ECMs. Quantification was performed as in B. Scale bars = 50 μm.

2.7. Image acquisition and analysis

Images of 2D cultures and brightfield images of 3D scaffolds and 2D hydrogels were captured on a Nikon Eclipse 90i microscope using a Nikon DS-Qi2 HQ camera or a DS-U3 color camera (Nikon) and NIS Element BR software.

Two-photon confocal imaging was performed using an upright multiphoton Zeiss LSM 7 MP microscope equipped with a pulsed laser adjustable from 690 to 1080 nm and a 20X plan-Apo water immersion objective.

Confocal images were acquired on an upright Leica SP8 confocal microscope equipped with 2 PMT detectors and 488 nm, 552 nm and 638 nm diodes and a 25X physio objective.

For Light Sheet Fluorescence Microscopy, samples were first embedded in 1% low-melt agarose and specimens were imaged from the side with a 2X objective and a 561 nm laser.

SEM imaging was performed using a Hitachi S-3700 microscope with an acceleration voltage ranging from 1,5 kV–2 kV.

Dynamic Speckle Imaging (DSI) [43] was performed for whole 3D epithelium high-resolution imaging. This technique produces fast 3D

resolution imaging and combines high sectioning properties together with high lateral resolution. The method consists in producing hundreds (200 during the experiments performed in this work) of speckle illumination in each acquisition plane along the depth of the sample. A post treatment combining pre-filtering of each raw image with statistical analysis based on the square root of the variance was made with a homemade Matlab software. This process enables a confocal imaging of the entire biological object and preserves the lateral resolution up to 700 μm depth. Indeed, speckle illumination is known to be poorly sensitive to optical aberrations or scattering [44] and this reduces problems of working distance (a 0.14 NA microscope lens was used for the collection of fluorescence emission). All images were treated and analyzed with the Fiji Software.

2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed on three independent experiments using the GraphPad Prism 6.0 Software. Differences between groups were considered statistically significant if $p < 0.05$. Data were compared using one-way ANOVA followed by Bonferroni correction for

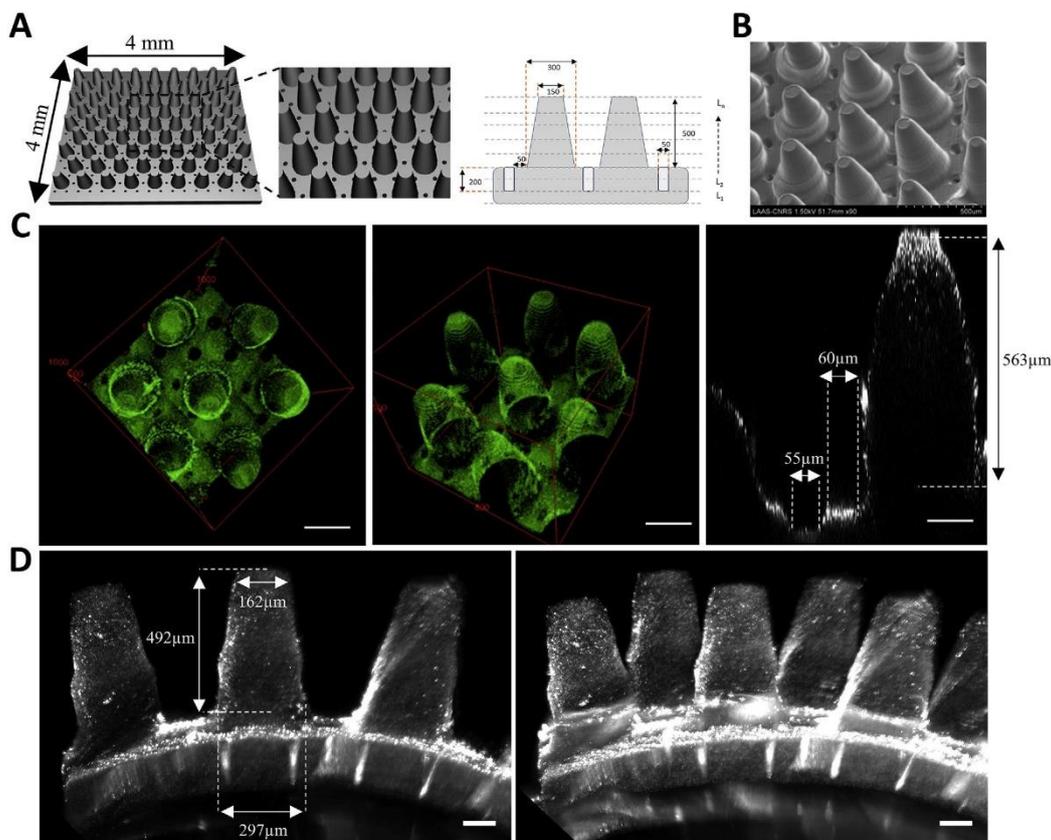


Fig. 3. 3D printing and imaging of intestinal scaffold. **A.** CAD design and schematic of the 3D intestinal scaffold mimicking the topography and dimensions of murine intestinal epithelium. Numbers are in μm . Scaffolds were printed using a photopolymerizable hydrogel composed of 40% PEG-DA 700, 30% acrylic acid and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fibronectin, fluorescent beads were added to visualize the scaffolds by fluorescence microscopy. **B.** SEM images of the 3D scaffold. **C.** 3D reconstructions (left and middle) and xz section (right) of the scaffold image by two-photon microscopy. **D.** Side view of the scaffold image (left) with Light Sheet Fluorescence Microscopy and 3D reconstruction (right). Scale Bars = 100 μm .

multiple comparisons. Data are presented as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Development of a new photosensitive hydrogel

The goal of this study was to develop a new 3D model of intestinal epithelium using high-resolution 3D printing (Fig. 1). One of the main challenges was to develop a material compatible with cell culture adapted to a 3D printing process and offering optical properties suitable for fluorescence microscopy imaging. We selected PEG-DA polymer as a base material to form hydrogel through radical polymerization in presence of photoinitiator [45]. PEG-DA hydrogels were previously reported to constitute poor substrates for cellular adhesion due to their protein repelling properties [32,39]. To improve cellular adhesion, we investigated the addition of acrylic acid to PEG-DA to form composite hydrogel networks. Acrylic acid reacts with PEG-DA and provides free carboxylic groups that negatively charge the resulting hydrogel. These groups were shown to promote protein adhesion at neutral pH (Fig. 2A) [42]. After polymerization, the remaining acrylic acid species that did not react were extracted from the polymer matrix by several washes in culture medium to reestablish a neutral pH in the scaffold and avoid potential toxicity on cell cultures. Cell adhesion and biocompatibility of PEG-DA hydrogels complemented or not with acrylic acid and/or ECMs

were evaluated after 6 days of culture with SW480 colorectal cancer cells (Fig. 2B and C). While the presence of fibronectin in pure PEG-DA hydrogel was not efficient to promote cell adhesion, addition of both acrylic acid and fibronectin dramatically improved cell adhesion and growth, and after 6 days of culture a confluent monolayer was observed (Fig. 2B). We investigated the influence of PEG-DA on cell culture using hydrogels containing proportions of PEG-DA 700 varying from 30% up to 60% (Fig. S1). A minimum concentration of 30% (vol/vol) PEG-DA was necessary to permit Irgacure 819 solubilization and allow polymerization. We found that 40% of PEG-DA provided the best adhesion and proliferation for SW480 cells.

Comparisons of different ECMs, including fibronectin, collagen-1 and laminin were also performed. Results indicated that these three matrices similarly support cell adhesion and proliferation (Fig. 2C). Likewise, the optimal concentration of each matrix within the hydrogel was determined for SW480 cells (Fig. S2). Overall, fibronectin at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was identified as the most favorable concentration for cell adhesion and was chosen for subsequent experiments. These results were confirmed with two other cell lines, Caco-2 (Fig. S3) and HeLa cells (data not shown). Importantly, addition of fibronectin to PEG-DA hydrogel in absence of acrylic acid did not efficiently promote cell adhesion, and the presence of acrylic acid with fibronectin or laminin was necessary to allow cell adhesion and support cell growth for 6 days (Fig. S3). Thus, the retained hydrogel formulation for subsequent

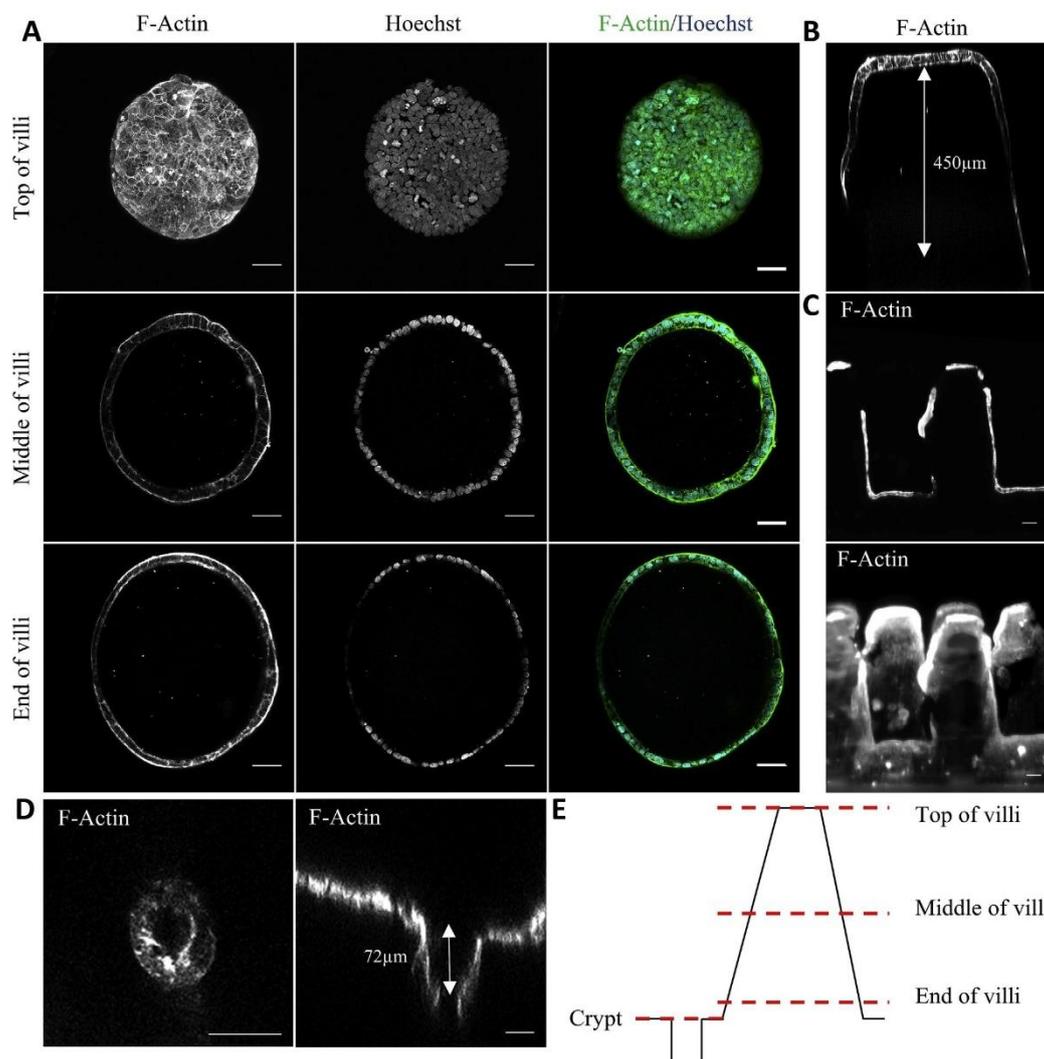


Fig. 4. Cell culture on intestinal scaffolds. Representative images of Caco-2 cells seeded on intestinal scaffolds. Cells were grown for 6 days fixed and then stained for DNA (Hoechst 33342, blue) and F-actin (FITC-Phalloidin, green). **A.** Two-photon imaging of the top, middle and base of the villi. Scale bars = 50 μm . **B.** xz section of a single villus imaged by two-photon microscopy. **C.** Side view of the scaffold (top) and 3D reconstruction (bottom) of Light Sheet Fluorescence Microscopy acquisition. Scale bars = 100 μm . **D.** xy and xz confocal microscopy images of the crypt compartment. Scale bars = 50 μm . **E.** Schematic showing the different horizontal cross-sections imaged on the 3D scaffold. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

experiments was 40% PEG-DA 700 + 30% acrylic acid + 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronectin + 0.1% Irgacure 819 + 30% culture medium.

It is difficult to provide a hierarchical ranking of the parameters influencing cell behavior. As a first hypothesis, the variation of the PEG-DA/acrylic acid ratio may influence the density of carboxylic acid groups available that in return promotes protein and cell adhesion. Another hypothesis is that cell proliferation could be affected by the mechanical and viscoelastic properties of the hydrogel scaffold. All these parameters are closely dependent on the material composition and their interplay may strongly influence cell proliferation and differentiation. Investigations are ongoing to decipher the influence of the PEG-DA/acrylic acid ratio on the material stiffness of the printed scaffold by Atomic Force Microscopy (AFM). Preliminary AFM data indicates a young modulus of 92 ± 9.8 kPa for the selected hydrogel formulation (40% PEGDA, 30% acrylic acid and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$

fibronectin). Interestingly, addition of fibronectin induced a significant stiffening of the resulting material with a young modulus value varying from 40 ± 8.7 kPa for the PEG-DA/acrylic acid mix up to 90 kPa with fibronectin. This phenomenon may be explained by the interactions between fibronectin and the carboxylic groups provided by acrylic acid that induce a crosslinking effect in the matrix.

3.2. Fabrication of intestinal scaffolds

Three-dimensions scaffolds were printed using high-resolution stereolithography (SLA) 3D printing. The 3D printer (Dilase 3D, Kloe France) uses a 405 nm laser to print objects in a layer-by-layer building process [31]. Each individual scaffold measured 4×4 mm (x,y) with a total thickness of 0.75 mm. The topography was designed to reproduce the architecture and dimensions of the murine intestinal epithelium.

Each single villus was surrounded by 6 crypts. Villi were 500 μm high, with a diameter of 150 μm at the top and 300 μm at the base. Crypt wells were 200 μm deep with a diameter of 50 μm (Fig. 3A). Intestinal scaffolds were printed on a DS3000 photoresist backplane to promote attachment of the hydrogel. We did not observe any noticeable cytotoxic effect of DS3000 on cell culture (data not shown). Scanning electron microscopy (SEM) images showed faithful replication of the design and reproducibility of the printing (Fig. 3B). Dehydration of the hydrogel before SEM imaging resulted in partial collapse of the structures, impeding accurate measurement of the structures' dimensions. As PEG-DA is optically transparent in the visible range, 300 nm diameter fluorescent nanoparticles were added to the hydrogel to measure the 3D scaffold dimensions by two-photon microscopy and Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM). Both imaging technologies allowed visualization of the villi of the scaffold. Although LSFM has an intrinsic resolution lower than two-photon imaging, it allows the visualization of a larger field including multiple rows of the scaffolds. Measures performed on two-photon images showed dimensions of $574 \pm 15 \mu\text{m}$ ($n = 10$), compared to an initial programmed value of 500 μm . This expansion was confirmed on several samples observed showing a reproducible swelling of approximately 15%. This swelling effect may be related to the variation of pH (from 3.5 to 7.4) occurring between the fabrication process and the development step following printing. However, measures performed by LSFM showed high correspondence to the programmed dimensions (Fig. 3C–D). These differences of measurement may be explained by the fact that in LSFM, images are acquired from the side of the object and not from the top as in two-photon microscopy. Moreover, before imaging with LSFM, the sample was embedded in agarose, which may result in shrinking of the sample. Two-photon microscopy did not allow visualizing the crypt compartments, likely due to optical aberrations. Visualization of the crypt was possible by LSFM, but with a low resolution not allowing accurate measurements (Fig. 3D).

3.3. Suitability of 3D scaffolds for tissue culture

Three-dimensional hydrogel scaffolds supported adhesion and growth of Caco-2 cells. After 6 days of culture, a cell monolayer was observed around villi, with no cells inside the gel (Fig. 4A–C, E). LSFM imaging showed that the scaffold surface was not entirely covered by cells (Fig. 4C), indicating that 6 days of culture may not be sufficient for cells to proliferate and migrate to cover the entire structure uniformly. Focus on the crypt compartment by confocal imaging showed that cells also formed a continuous monolayer inside the crypt-like wells of the scaffold (Fig. 4D). However, we only observed cells down to a $72 \pm 4 \mu\text{m}$ depth. This value is significantly lower than the values of crypt depth measured before cell culture. We believe that the swelling effects observed earlier could result in a global compressive force and thus in a decrease of the crypt diameter that limits cell invasion within the structures. This swelling effect could be compensated by adapting the STL file and increasing crypt diameter to obtain the correct dimensions in culture conditions.

3.4. Effect of 3D culture on cell differentiation

Caco-2 cells are known to differentiate spontaneously over time. After 21 days of culture they acquire properties similar to intestinal enterocytes and form a highly polarized epithelium with tight junctions [15,46]. To study the impact of our 3D model on Caco-2 cell differentiation, we compared cells grown on various substrates for up to 21 days. First, the impact of the hydrogel was evaluated. Caco-2 cells were seeded on 2D hydrogel printed with the Dilase 3D or on glass coverslip, coated or not with fibronectin. F-Actin staining showed that Caco-2 cells formed a confluent monolayer in all three culture conditions (Fig. 5). However, cells grown on glass, coated or not with fibronectin, formed a highly flattened epithelium and exhibited no apico-basal

polarization of nuclei or actin (Fig. 5A and B). On the contrary, cells that grew on 2D hydrogels exhibited an elongated morphology with apical actin and basal nuclei (Fig. 5C). Interestingly, cultures on 2D hydrogel reproducibly formed 3D structures, previously described as villi-like structures [47,48]. For example, Fig. 5C shows a cross section of a 115 μm -high cellular structure displaying strong polarization of the actin network. This improved polarization of Caco-2 cells was not solely due to the presence of fibronectin in the hydrogel since cells that grew on fibronectin coated glass did not exhibit this characteristic morphology (Fig. 5B).

Polarization of Caco-2 cells was then evaluated on 3D intestinal scaffolds. High-resolution dynamic speckle imaging [43] allowed a complete visualization of the 3D scaffold and after 21 days of culture, cells had colonized it entirely, from the crypt base to the top of villi (Fig. 6A). Observation of the scaffold at 21 days showed that the structure had maintained its integrity and that the hydrogel was not degraded by cells (Fig. 6B). However, villi dimensions were significantly higher compared to measures obtained directly after printing (villi height = $728 \pm 64 \mu\text{m}$ after 21 days of culture, $n = 10$), suggesting a progressive swelling of the gel over time (Fig. 6B). Monitoring of cellular morphology by F-actin staining showed that at 21 days post seeding, the epithelium was polarized, with apical actin and basal nuclei (visualized on the side of villi), while at 18 days of culture, the F-actin network was not fully organized yet (Fig. 6C and D). Caco-2 cells were previously shown to become more elongated during differentiation [49,50]. Thus, we measured the height of cells cultivated on different substrates on vertical sections. Interestingly, after 6 and 21 days of culture, cells grown on hydrogels (in 3D or 2D) were more elongated compared to cultures on glass coverslips (Fig. 6E), suggesting a better differentiation and confirming morphological observations. The presence of ECM in the hydrogel cannot explain this phenotype, as cells grown on fibronectin-coated glass exhibited poorly organized actin network and were less elongated than on 2D hydrogels (Fig. 6E). Cell length increased over time and was significantly higher in 3D at 21 days of culture compared to 6 days. However, only a slight elongation ($< 3 \mu\text{m}$) was observed on 2D hydrogels between 6 and 21 days of culture. Finally, there was a marked increase in cell length when grown on 3D scaffolds compared to 2D hydrogel, suggesting that the 3D topography provides cues promoting cell polarization that are not available in 2D (Fig. 6E).

To further evaluate the importance of 3D topography, we determined the influence of villus length on cell differentiation. For this, scaffolds were printed with 500 μm or 1500 μm high villi and seeded with Caco-2 cells for 21 days (Fig. S4). Monitoring of cell morphology with F-actin and β -catenin staining and cell height measurements did not reveal any difference and we observed a polarized epithelium with elongated cells, apical actin and membrane β -catenin in both conditions (Fig. S4 B–D). Thus, villi lengthening from 500 μm to 1500 μm does not appear to improve cell polarization.

Improved differentiation of cells grown on 3D scaffolds may be caused by distinct mechanical properties of the hydrogel, as well as surface topography and roughness. The latter was assessed by AFM and SEM imaging (Fig. S5). By SEM, the surface of the hydrogel was slightly uneven, with a regular motif probably caused by laser writing (Fig. S5 A, B). Measurements of surface topography by AFM revealed that the surface of 3D scaffolds was rougher than that of 2D hydrogels (Fig. S5 C, D). Indeed, measurements performed on cross sections indicated that the Rugosity average (Ra) was 419.3 nm for 3D hydrogel compared to a Ra = 85.78 nm for 2D hydrogel.

Differentiated absorptive enterocytes exhibit strong expression of villin, cytokeratin, phosphatase alkaline and membrane localization of β -catenin. The expression of differentiation markers by Caco-2 cells grown on 2D or 3D hydrogels was investigated after 21 days of culture (Fig. 7). As previously, cells exhibited strong apical F-actin staining in 3D, as well as extensive lateral junction localization of β -catenin, while these were only observed on limited subsets of cells on 2D hydrogels

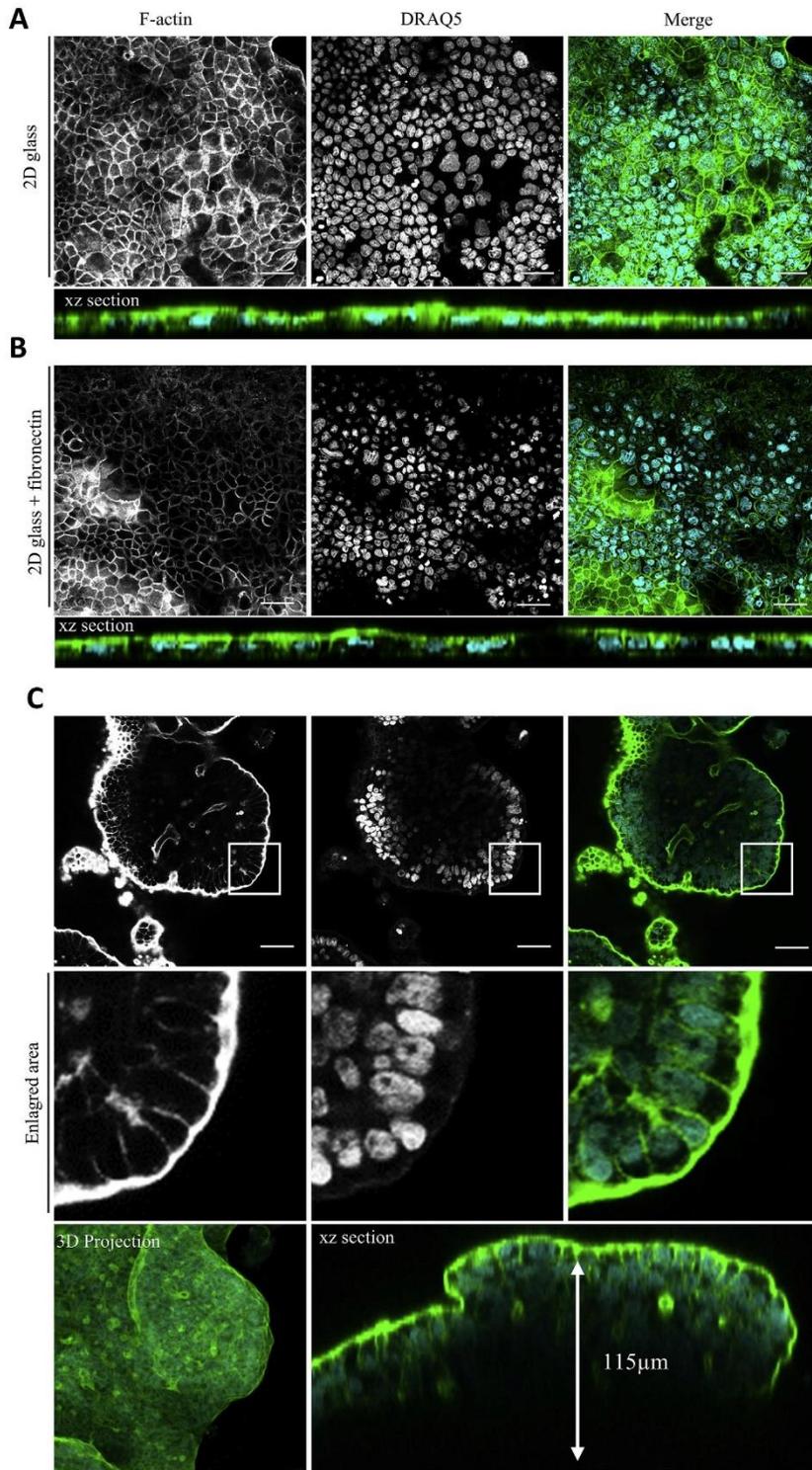


Fig. 5. PEG-DA hydrogel induces apico-basal polarization of Caco-2 cells. Cells were plated on uncoated glass coverslips (A), glass coverslips coated with fibronectin (B), or on 2D hydrogel (C). After 21 days, cells were fixed and stained for F-actin with Phalloidin- FITC (green) and nuclear DNA with DRAQ5 (blue). **A-B.** xy and xz view of Caco-2 cells cultured on uncoated glass coverslip (A) or fibronectin coated coverslips (B) for 21 days. **C.** Cellular morphology of Caco-2 cells grown on 2D PEG-DA/acrylic acid/fibronectin hydrogel for 21 days, 3D reconstruction of Z-stack imaging (lower left) and xz section (lower right) by confocal imaging. These experiments were realized on 3 independent samples. Scale bars = 50 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

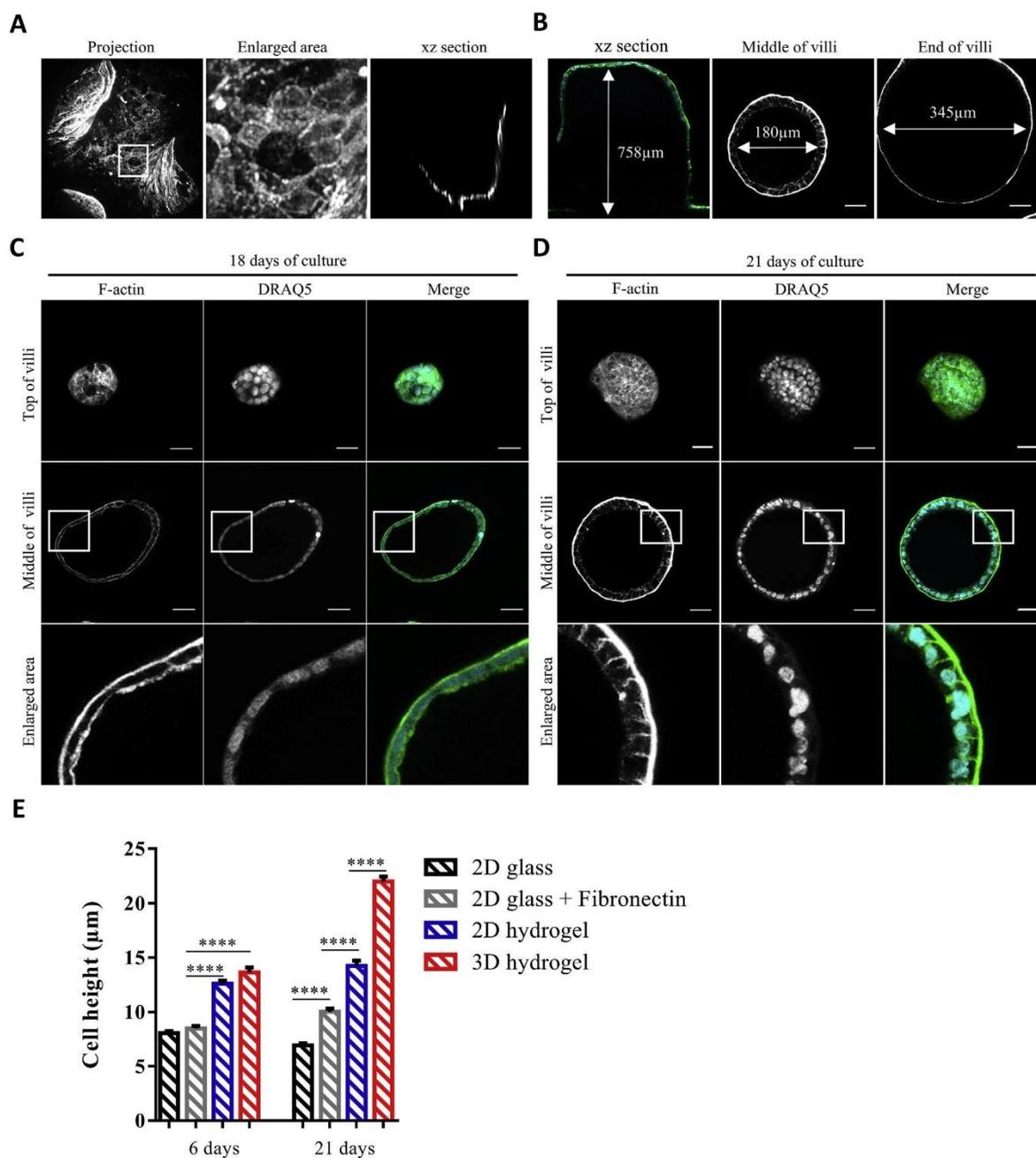
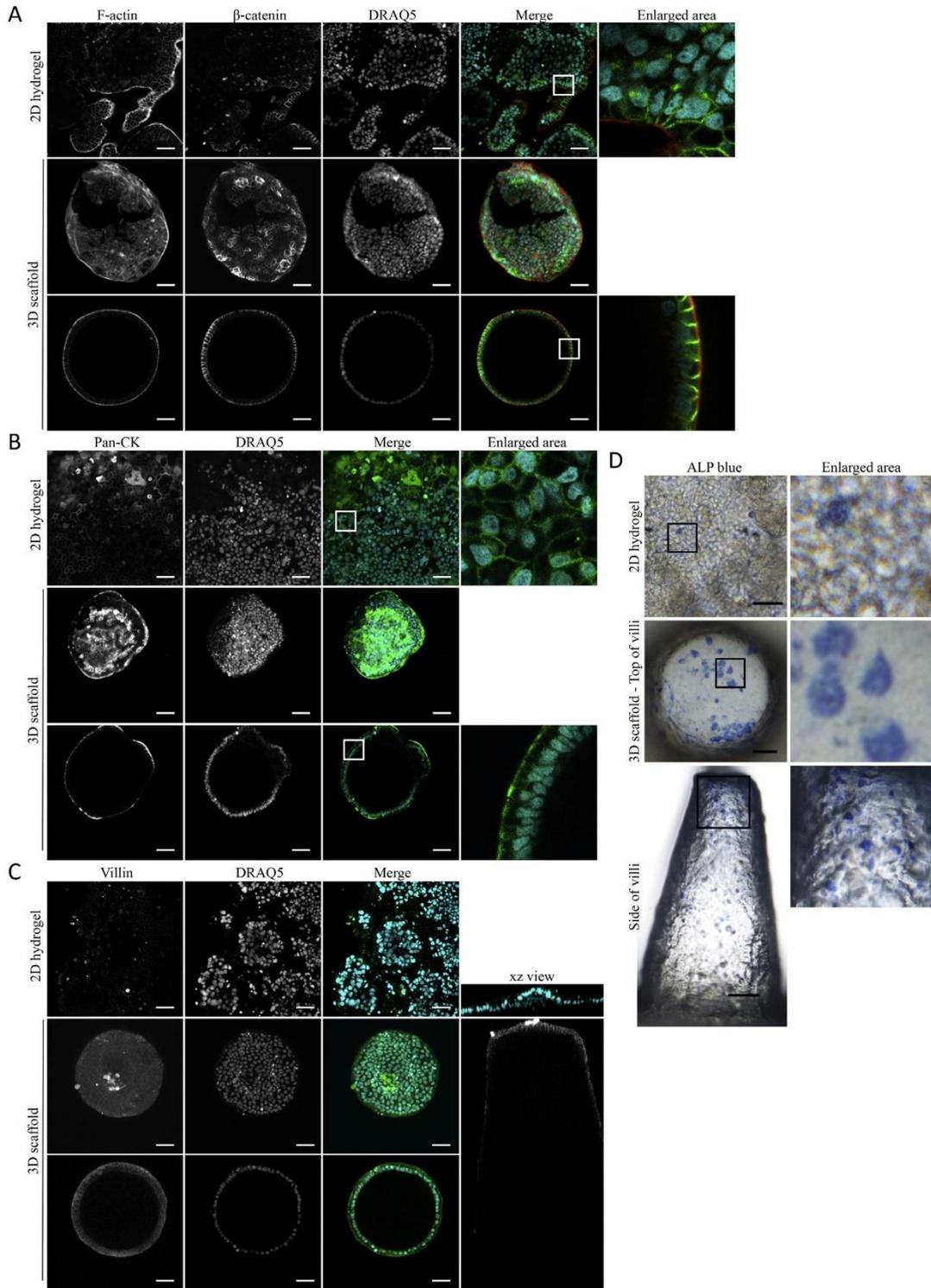


Fig. 6. Caco-2 cells form a polarized epithelium on 3D scaffold. Cells were plated on 3D scaffold and after 18 or 21 days, cells were fixed and stained for nucleic acid (DRAQ5, blue) and F-actin (Phalloidin-FITC, green). **A.** 3D reconstruction of the scaffold by high-resolution dynamic speckle illumination imaging (left), focus on crypt level (middle) and xz section (right). **B.** Confocal imaging of villi xy section (left) and xz sections of the middle and base of a single villus (middle and right, respectively). **C-D.** Cellular morphology and actin polarization of cells cultured on 3D scaffolds for 18 and 21 days, respectively. These experiments were realized on 3 independent scaffolds. **E.** Average height of Caco-2 cells grown on 2D hydrogels or 3D scaffolds. Scale bar = 50 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(Fig. 7A). Similarly, cytokeratin staining gave abundant apicolateral signal on cells grown on 3D scaffolds compared to 2D hydrogels where it was restricted to the lateral junction of only a subpopulation of cells (Fig. 7B). Strikingly, Caco-2 cells grown on 3D scaffolds expressed villin

and exhibited alkaline phosphatase activity, while it was absent or gave only weak staining in cells on 2D hydrogel (Fig. 7 C, D), indicating that 3D topography provides additional cues that promote cellular differentiation, independently of the adhesion substrate. Interestingly, in 3D,



(caption on next page)

Fig. 7. Caco-2 cells differentiates in 3 dimensions. Cells were seeded on 3D scaffolds or 2D hydrogels printed with the Dilase 3D. After 21 days of culture, cells were fixed and stained for F-actin, β -catenin, Pan-cytokeratin or villin. Nuclear DNA was stained with DRAQ5 (blue). **A.** Confocal imaging of β -catenin/F-actin co-staining on 2D or 3D hydrogels. **B.** Confocal imaging of Pan-cytokeratin staining (green) of Caco-2 grown on 2D or 3D hydrogels. **C.** xy and xz view of Caco-2 cells grown on 2D or 3D hydrogels stained for villin (green). **D.** Brightfield images of staining for alkaline phosphatase activity (blue) of Caco-2 grown on 2D or 3D hydrogels. Scale bars = 50 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

villin and alkaline phosphatase staining were preferentially located towards the top of villi, suggesting a compartmentalization of the cells, with more differentiated cells located at the top of the villi, as observed *in vivo*. These results suggest that 3D architecture promotes cell differentiation and organization compared to 2D monolayer cultures.

4. Discussion

The intestinal epithelium presents a characteristic architecture with high aspect ratio villus and crypt compartments that exhibit distinct and intricate biochemical and biophysical environments. The existing *in vitro* systems, either 2D monolayer or 3D organoid cultures, do not faithfully reproduce this complex 3D microenvironment. Thus, over the last few years, intense efforts have been devoted to recreate this complex environment and recapitulate the topography of the small intestine for *in vitro* culture using microengineering approaches, with varying degrees of success [23,51]. In this study, we developed a 3D scaffold mimicking the intestinal architecture using for the first time a PEG-DA/acrylic acid hydrogel enriched with fibronectin using a new 3D printing system [31].

We found that both the use of a hydrogel material and the micro-structuration of the surface with 3D topology is strongly influencing cell behavior. In fact, we showed that compared to traditional 2D cultures, Caco-2 cells grown on a 3D scaffold exhibit an improved differentiation and acquisition of an epithelial morphology with expression of enterocyte markers. These results indicate that the 3D morphology of the scaffold strongly impacts cell differentiation in our model, highlighting the importance of the 3D topography on cellular behavior. Other studies performing cultures on 3D scaffolds made with other materials or providing gradient biochemical stimulation similarly found that a 3D microenvironment promotes cell differentiation and offer a more physiologically relevant model to study the intestinal epithelium [16,18,21,23].

As a proof of concept, the scaffold was made with a single hydrogel and a uniform environment. However, multiple gradients (growth factors, ECMs, oxygen, inflammatory signals ...) have been described *in vivo* along the length of the crypt/villus axis [51]. For instance, concentrations of ECM proteins vary and adopt a specific distribution depending on the compartment. Indeed, different laminin subtypes are regionally expressed along the crypt/villus axis: laminin α 2 is enriched in the crypts, while laminin α 5 and α 3 are expressed in villi [52,53]. Laminin α 5 was shown to play a crucial role in the maintenance of the mucosa and architecture, suggesting a relationship between ECM deposition and functional intestinal cell differentiation [54]. Other ECM proteins are also distributed regionally, including fibronectin, which is expressed preferentially in the crypt basement membrane [55]. Changes in ECM composition suggest variations of stiffness, although it has not been directly measured *in vivo* due to technical limitations, and ECM mechanical properties are known to be important in the regulation of stem cell proliferation and fate [56]. A recent study using defined matrices for intestinal organoid cultures highlighted the importance of biochemical and biophysical roles of ECM in intestinal stem cell proliferation and differentiation [57]. Using customized PEG hydrogels, it was demonstrated that high matrix stiffness promotes ISCs expansion through YAP/Hippo pathway signaling, while soft and degradable matrices and the presence of laminin α 1 β 1 γ 1 were needed for cell differentiation [41,57]. For these reasons, it would be interesting to print 3D scaffolds using several hydrogels to recreate the different ECM composition to mimic these gradients along the crypt/villus axis and

recapitulate more accurately the intestinal environment. Moreover, synthetic materials such as PEG-DA hydrogels are chemically and physically tunable, allowing their modification to modulate regional stiffness. In this work, we investigated the impact of both concentrations of PEG-DA and acrylic acid. We believe that the composition of the material may influence both the surface roughness and the mechanical properties, in particular the material's stiffness that could in return impact cell adhesion and proliferation. AFM measurements are currently in progress to investigate the correlation between cell culture results and the local stiffness sensed by the cells individually or when forming an epithelium.

Finally, gradients of soluble growth factors in the intestine are critical to control cell specification and proliferation. Among these, the Wnt/ β -catenin pathway plays a crucial role for the maintenance and proliferation of intestinal stem cells [58], Wnt ligands are secreted by several crypt cells including Paneth cells and mesenchymal cells surrounding the crypts [59,60]. Other signaling pathways that are essential in the crypt include Notch, BMPs and Eph/Ephrin [4]. Most of these signals are secreted by the mesenchymal compartment, which contains multiple cell populations [61]. These reports underscore the importance of the cellular niche in the intestinal environment and to fully recreate a physiological *in vitro* model, this cellular niche should be integrated. With recent progress in bioprinting, it is now possible to print 3D matrices containing cells [62]. With adequate materials and 3D printing technology, we can now envision printing of 3D scaffolds mimicking the architecture of intestinal epithelium and containing supporting mesenchymal cells.

5. Conclusion

Herein, we describe a new 3D culture model mimicking the architecture of the intestinal epithelium. First, we developed a PEG-DA/acrylic acid hydrogel mix that supports cell adhesion and growth. This material is optically transparent, it exhibits a good compatibility with cell culture and can be easily tailored with a large variety of matrices. We then showed that this hydrogel mix can be advantageously combined with stereolithography to generate 3D scaffolds accurately recapitulating the intestinal topography. In addition, we showed by image analyses that compared to 2D cultures, cell culture on these 3D hydrogel scaffolds improved differentiation of Caco-2 intestinal epithelial cells. This 3D model could constitute an *in vitro* platform for studying fundamental mechanisms that drive intestinal homeostasis and regeneration. Beyond its application to intestinal tissues, the proposed approach provides a generic fabrication method that directly benefits from the flexibility of 3D printing technologies for the fabrication of 3D architectures with a resolution at the sub-cellular level. It opens new routes for the fabrication of *in vitro* microenvironment models with controlled topography either devoted to fundamental studies or used as standardized platforms for drug testing.

Acknowledgements

J.C. was supported by a studentship from the Region Midi-Pyrénées and Université Paul Sabatier – Toulouse III. This project was supported by funds from the Ligue Nationale Contre le Cancer, Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer and an “FRM Equipes” grant (DEQ20170336707) from the Fondation pour la Recherche Médicale to A.B.

This work was supported by the French RENATECH network. It was

partly supported as part of the MultiFAB project funded by FEDER European Regional Funds and French Région Occitanie (grant agreement number 16007407/MP0011594) and by the HoliFAB project funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement No 760927).

The authors thanks Sophie Allart and Danielle Daviaud (CPTP, Toulouse) for assistance with multiphoton imaging, Jacques Rouquette and Lise Teysseire (ITAV, Toulouse) for LSFM imaging acquisitions and Brice Ronsin and Stephanie Bosch (CBI, Toulouse) for confocal imaging.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119404>.

References

- [1] N. Barker, Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (1) (2014) 19–33.
- [2] N. Barker, J.H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haeghebarth, J. Korving, H. Begthel, P.J. Peters, H. Clevers, Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*, *Nature* 449 (7165) (2007) 1003–1007.
- [3] A.J.M. Santos, Y.H. Lo, A.T. Mah, C.J. Kuo, The intestinal stem cell niche: homeostasis and adaptations, *Trends Cell Biol.* 28 (12) (2018) 1062–1078.
- [4] H. Clevers, The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment, *Cell* 154 (2) (2013) 274–284.
- [5] X.C. He, J. Zhang, W.G. Tong, O. Tawfik, J. Ross, D.H. Scoville, Q. Tian, X. Zeng, X. He, L.M. Wiedemann, Y. Mishina, L. Li, BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling, *Nat. Genet.* 36 (10) (2004) 1117–1121.
- [6] H. Clevers, K.M. Loh, R. Nusse, Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control, *Science* 346 (6205) (2014) 1248012.
- [7] L.P. Pageot, N. Perreault, N. Basora, C. Francoeur, P. Magny, J.F. Beaulieu, Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis, *Microsc. Res. Tech.* 49 (4) (2000) 394–406.
- [8] M.A. Lancaster, J.A. Knoblich, Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies, *Science* 345 (6194) (2014) 1247125.
- [9] T. Sato, 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, H. Clevers, Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium, *Gastroenterology* 141 (5) (2011) 1762–1772.
- [10] T. Sato, 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, H. Clevers, Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche, *Nature* 459 (7244) (2009) 262–265.
- [11] X. Yin, B.E. Mead, H. Safaee, R. Langer, J.M. Karp, O. Levy, Engineering stem cell organoids, *Cell Stem Cell* 18 (1) (2016) 25–38.
- [12] J. Yu, R.L. Carrier, J.C. March, L.G. Griffith, Three dimensional human small intestine models for ADME-Tox studies, *Drug Discov. Today* 19 (10) (2014) 1587–1594.
- [13] S.N. Bhatia, D.E. Ingber, Microfluidic organs-on-chips, *Nat. Biotechnol.* 32 (8) (2014) 760–772.
- [14] G. Rossi, A. Manfrin, M.P. Lutolf, Progress and potential in organoid research, *Nat. Rev. Genet.* 19 (11) (2018) 671–687.
- [15] I.J. Hidalgo, T.J. Raub, R.T. Borchardt, Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology* 96 (3) (1989) 736–749.
- [16] C.M. Costello, J. Hongpeng, S. Shaffiey, J. Yu, N.K. Jain, D. Hackam, J.C. March, Synthetic small intestinal scaffolds for improved studies of intestinal differentiation, *Biotechnol. Bioeng.* 111 (6) (2014) 1222–1232.
- [17] C.M. Costello, R.M. Sorna, Y.L. Goh, I. Cengic, N.K. Jain, J.C. March, 3-D intestinal scaffolds for evaluating the therapeutic potential of probiotics, *Mol. Pharm.* 11 (7) (2014) 2030–2039.
- [18] J. Yu, S. Peng, D. Luo, J.C. March, In vitro 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (9) (2012) 2173–2178.
- [19] Y. Chen, Y. Lin, K.M. Davis, Q. Wang, J. Rnjak-Kovacic, C. Li, R.R. Isberg, C.A. Kumamoto, J. Mecas, D.L. Kaplan, Robust bioengineered 3D functional human intestinal epithelium, *Sci. Rep.* 5 (2015) 13708.
- [20] M.B. Esch, J.H. Sung, J. Yang, C. Yu, J. Yu, J.C. March, M.L. Shuler, On chip porous polymer membranes for integration of gastrointestinal tract epithelium with microfluidic 'body-on-a-chip' devices, *Biomed. Microdevices* 14 (5) (2012) 895–906.
- [21] J.H. Sung, J. Yu, D. Luo, M.L. Shuler, J.C. March, Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model, *Lab Chip* 11 (3) (2011) 389–392.
- [22] L. Wang, S.K. Murthy, W.H. Fowle, G.A. Barabino, R.L. Carrier, Influence of micro-well biomimetic topography on intestinal epithelial Caco-2 cell phenotype, *Biomaterials* 30 (36) (2009) 6825–6834.
- [23] Y. Wang, D.B. Gunasekara, M.I. Reed, M. DiSalvo, S.J. Bultman, C.E. Sims, S.T. Magness, N.L. Allbritton, A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium, *Biomaterials* 128 (2017) 44–55.
- [24] Y. Wang, R. Kim, D.B. Gunasekara, M.I. Reed, M. DiSalvo, D.L. Nguyen, S.J. Bultman, C.E. Sims, S.T. Magness, N.L. Allbritton, formation of human colonic crypt array by application of chemical gradients across a shaped epithelial monolayer, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5 (2) (2018) 113–130.
- [25] S.V. Murphy, A. Atala, 3D bioprinting of tissues and organs, *Nat. Biotechnol.* 32 (8) (2014) 773–785.
- [26] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, D.H. Kim, 3D bioprinting for engineering complex tissues, *Biotechnol. Adv.* 34 (4) (2016) 422–434.
- [27] R. Zhang, N.B. Larsen, Stereolithographic hydrogel printing of 3D culture chips with biofunctionalized complex 3D perfusion networks, *Lab Chip* 17 (24) (2017) 4273–4282.
- [28] A.P. Zhang, X. Qu, P. Soman, K.C. Hribar, J.W. Lee, S. Chen, S. He, Rapid fabrication of complex 3D extracellular microenvironments by dynamic optical projection stereolithography, *Adv. Mater.* 24 (31) (2012) 4266–4270.
- [29] R. Gauvin, Y.C. Chen, J.W. Lee, P. Soman, P. Zorlutuna, J.W. Nichol, H. Bae, S. Chen, A. Khademhosseini, Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography, *Biomaterials* 33 (15) (2012) 3824–3834.
- [30] K.C. Hribar, P. Soman, J. Warner, P. Chung, S. Chen, Light-assisted direct-write of 3D functional biomaterials, *Lab Chip* 14 (2) (2014) 268–275.
- [31] A. Accardo, R. Courson, R. Riesco, V. Raimbault, L. Malaquin, Direct laser fabrication of meso-scale 2D and 3D architectures with micrometric feature resolution, *Addit. Manuf.* 22 (2018) 440–446.
- [32] E.A. Phelps, N. Landazuri, P.M. Thule, W.R. Taylor, A.J. Garcia, Bioartificial matrices for therapeutic vascularization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (8) (2010) 3323–3328.
- [33] M.E. Smithmyer, L.A. Sawicki, A.M. Kloxin, Hydrogel scaffolds as in vitro models to study fibroblast activation in wound healing and disease, *Biomater Sci* 2 (5) (2014) 634–650.
- [34] J.J. Moon, M.S. Hahn, I. Kim, B.A. Nsiah, J.L. West, Micropatterning of poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels with biomolecules to regulate and guide endothelial morphogenesis, *Tissue Eng. A* 15 (3) (2009) 579–585.
- [35] A. Urrios, C. Parra-Cabrera, N. Bhattacharjee, A.M. Gonzalez-Suarez, L.G. Rigat-Brugarolas, U. Nallapatti, J. Samitier, C.A. DeForest, F. Posas, J.L. Garcia-Cordero, A. Folch, 3D-printing of transparent bio-microfluidic devices in PEG-DA, *Lab Chip* 16 (12) (2016) 2287–2294.
- [36] M. Verhulsel, M. Vignes, S. Descroix, L. Malaquin, D.M. Vignjevic, J.L. Viovy, A review of microfabrication and hydrogel engineering for micro-organs on chips, *Biomaterials* 35 (6) (2014) 1816–1832.
- [37] M.P. Lutolf, J.A. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.* 23 (1) (2005) 47–55.
- [38] S.R. Caliali, J.A. Burdick, A practical guide to hydrogels for cell culture, *Nat. Methods* 13 (5) (2016) 405–414.
- [39] D. Guarnieri, A. De Capua, M. Ventre, A. Borzacchiello, C. Pedone, D. Marasco, M. Ruvo, P.A. Netti, Covalently immobilized RGD gradient on PEG hydrogel scaffold influences cell migration parameters, *Acta Biomater.* 6 (7) (2010) 2532–2539.
- [40] R. Cruz-Acuna, M. Quiros, A.E. Farkas, P.H. Dedhia, S. Huang, D. Siuda, V. Garcia-Hernandez, A.J. Miller, J.R. Spence, A. Nusrat, A.J. Garcia, Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair, *Nat. Cell Biol.* 19 (11) (2017) 1326–1335.
- [41] N. Gjorevski, M.P. Lutolf, Synthesis and characterization of well-defined hydrogel matrices and their application to intestinal stem cell and organoid culture, *Nat. Protoc.* 12 (11) (2017) 2263–2274.
- [42] L. Chen, H.Z. An, P.S. Doyle, Synthesis of nonspherical microcapsules through controlled polyelectrolyte coating of hydrogel templates, *Langmuir* 31 (33) (2015) 9228–9235.
- [43] C. Ventalon, R. Heintzmann, J. Mertz, Dynamic speckle illumination microscopy with wavelet prefiltering, *Opt. Lett.* 32 (11) (2007) 1417–1419.
- [44] J.W. Goodman, *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications*, Roberts and Company Publishers, 2007.
- [45] A. Accardo, M.C. Blatche, R. Courson, I. Loubinoux, C. Thibault, L. Malaquin, C. Vieu, Multiphoton direct laser writing and 3D imaging of polymeric freestanding architectures for cell colonization, *Small* 13 (27) (2017).
- [46] M. Natoli, B.D. Leoni, I. D'Agno, F. Zucco, A. Felsani, Good Caco-2 cell culture practices, *Toxicol. In Vitro* 26 (8) (2012) 1243–1246.
- [47] H.J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D.E. Ingber, Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow, *Lab Chip* 12 (12) (2012) 2165–2174.
- [48] H.J. Kim, D.E. Ingber, Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation, *Integr Biol (Camb)* 5 (9) (2013) 1130–1140.
- [49] M.D. Peterson, M.S. Mooseker, An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in Caco-2BBE cells, *J. Cell Sci.* 105 (Pt 2) (1993) 445–460.
- [50] E. Bazellieres, D. Massey-Harroche, M. Barthelemy-Requin, F. Richard, J.P. Arsanto, A. Le Bivic, Apico-basal elongation requires a drebrin-EB-3 complex in columnar human epithelial cells, *J. Cell Sci.* 125 (Pt 4) (2012) 919–931.
- [51] Y. Wang, R. Kim, S.S. Hinman, B. Zwarycz, S.T. Magness, N.L. Allbritton, Bioengineered systems and designer matrices that recapitulate the intestinal stem cell niche, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5 (3) (2018) 440–453 e1.
- [52] L. Meran, A. Baulies, V.S.W. Li, Intestinal stem cell niche: the extracellular matrix and cellular components, *Stem Cell. Int.* 2017 (2017) 7970385.
- [53] I.C. Teller, J.F. Beaulieu, Interactions between laminin and epithelial cells in

- intestinal health and disease, *Expert Rev. Mol. Med.* 3 (24) (2001) 1–18.
- [54] Z.X. Mahoney, T.S. Stappenbeck, J.H. Miner, Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa, *J. Cell Sci.* 121 (Pt 15) (2008) 2493–2502.
- [55] Y.D. Benoit, J.F. Groulx, D. Gagne, J.F. Beaulieu, RGD-dependent epithelial cell-matrix interactions in the human intestinal crypt, *J Signal Transduct* 2012 (2012) 248759.
- [56] F. Guilak, D.M. Cohen, B.T. Estes, J.M. Gimble, W. Liedtke, C.S. Chen, Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix, *Cell Stem Cell* 5 (1) (2009) 17–26.
- [57] N. Gjorevski, N. Sachs, A. Manfrin, S. Giger, M.E. Bragina, P. Ordonez-Moran, H. Clevers, M.P. Lutolf, Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture, *Nature* 539 (7630) (2016) 560–564.
- [58] D. Pinto, A. Gregorieff, H. Begthel, H. Clevers, Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium, *Genes Dev.* 17 (14) (2003) 1709–1713.
- [59] A. Gregorieff, D. Pinto, H. Begthel, O. Destree, M. Kielman, H. Clevers, Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine, *Gastroenterology* 129 (2) (2005) 626–638.
- [60] Z. Kabiri, G. Greicius, B. Madan, S. Biechele, Z. Zhong, H. Zaribafzadeh, Edison, J. Aliyev, Y. Wu, R. Bunte, B.O. Williams, J. Rossant, D.M. Virshup, Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts, *Development* 141 (11) (2014) 2206–2215.
- [61] D.W. Powell, I.V. Pinchuk, J.I. Saada, X. Chen, R.C. Mifflin, Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria, *Annu. Rev. Physiol.* 73 (2011) 213–237.
- [62] L.R. Madden, T.V. Nguyen, S. Garcia-Mojica, V. Shah, A.V. Le, A. Peier, R. Visconti, E.M. Parker, S.C. Presnell, D.G. Nguyen, K.N. Retting, Bioprinted 3D primary human intestinal tissues model aspects of native physiology and ADME/tox functions, *iScience* 2 (2018) 156–167.

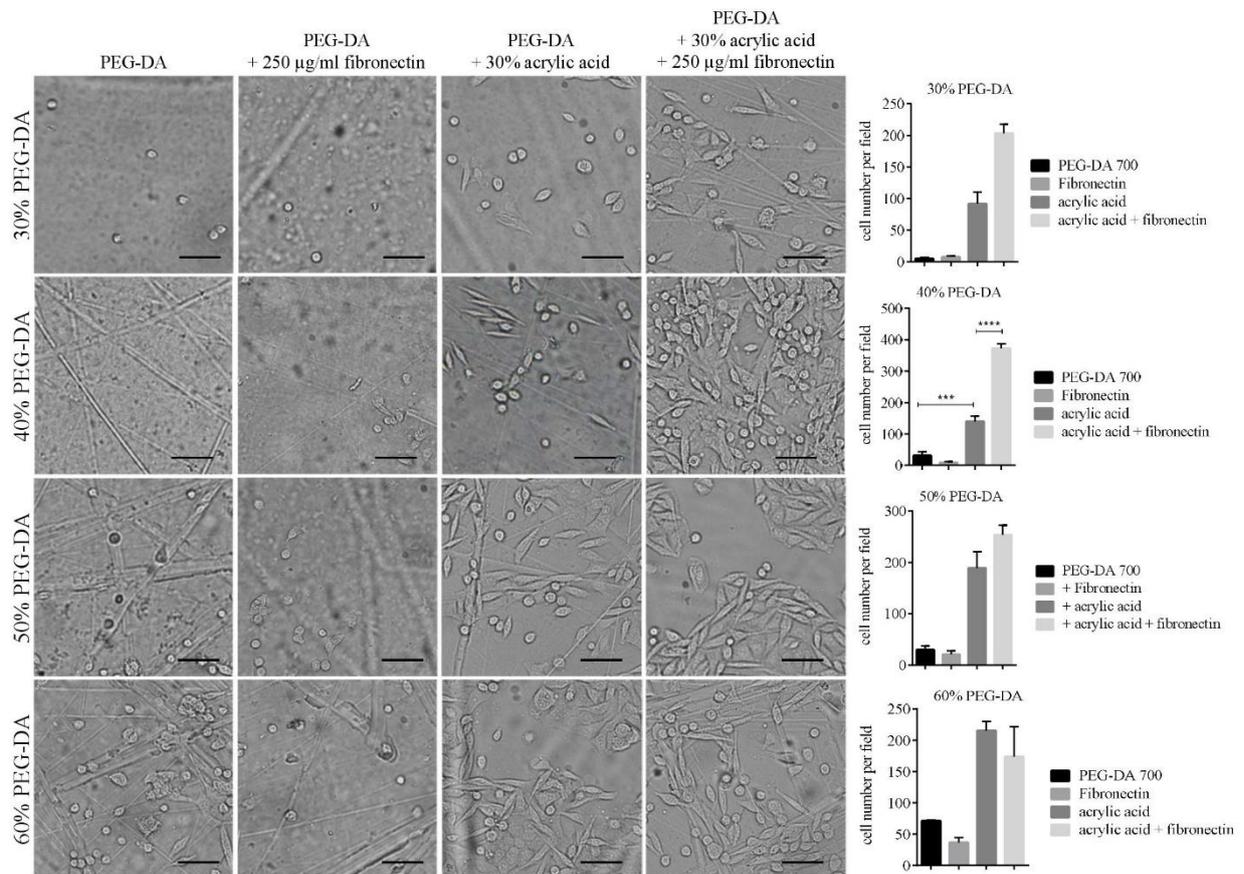


Figure S1: Determination of PEG-DA concentration

Representative phase-contrast images of SW480 cells cultured for 6 days on various hydrogels. Bar graphs show the number of cells counted per field (4 fields with a 20X objective). Cell were grown on 30%, 40%, 50% and 60% PEG-DA 700 hydrogels ± acrylic acid ± fibronectin. Scale bars = 50 µm. Images and graph for the 40% condition are reproduced from Fig. 2B.

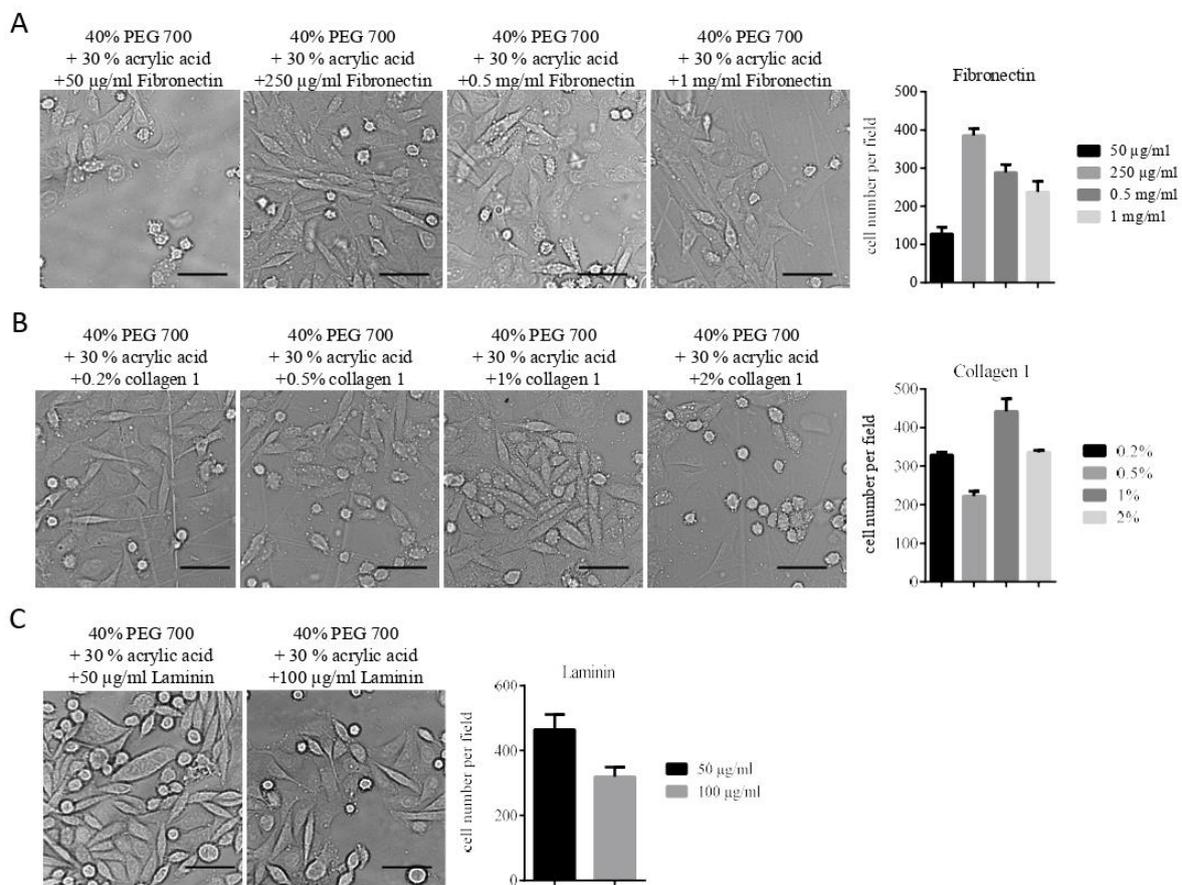


Figure S2: Optimization of ECM concentrations in hydrogels for tissue culture

Determination of the optimal concentrations of fibronectin (A), collagen-1 (B) or laminin (C) in 40% PEG-DA/30% acrylic acid hydrogels. Graphs show the number of cells counted per field from 4 fields with a 20X objective. Scale bars = 50 µm.

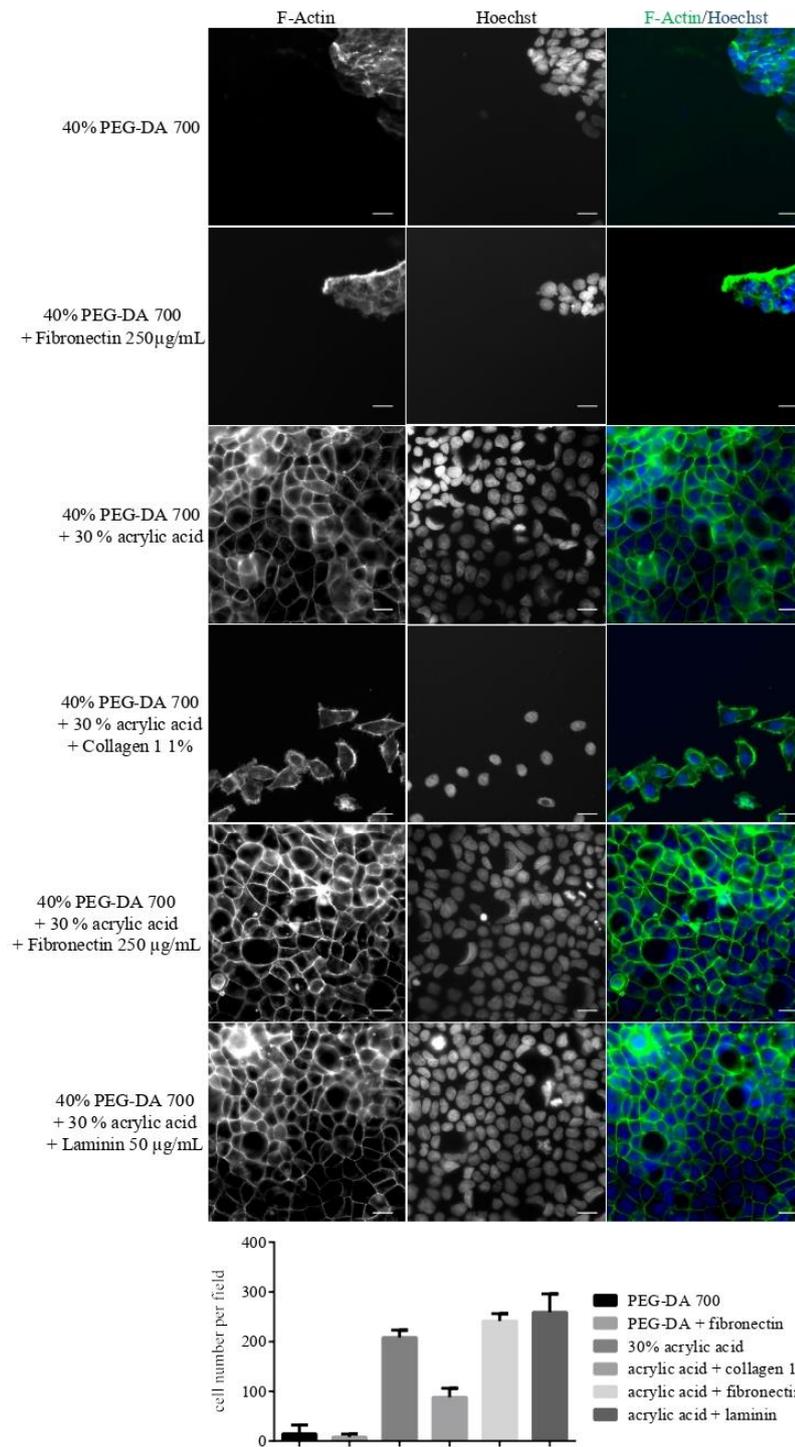
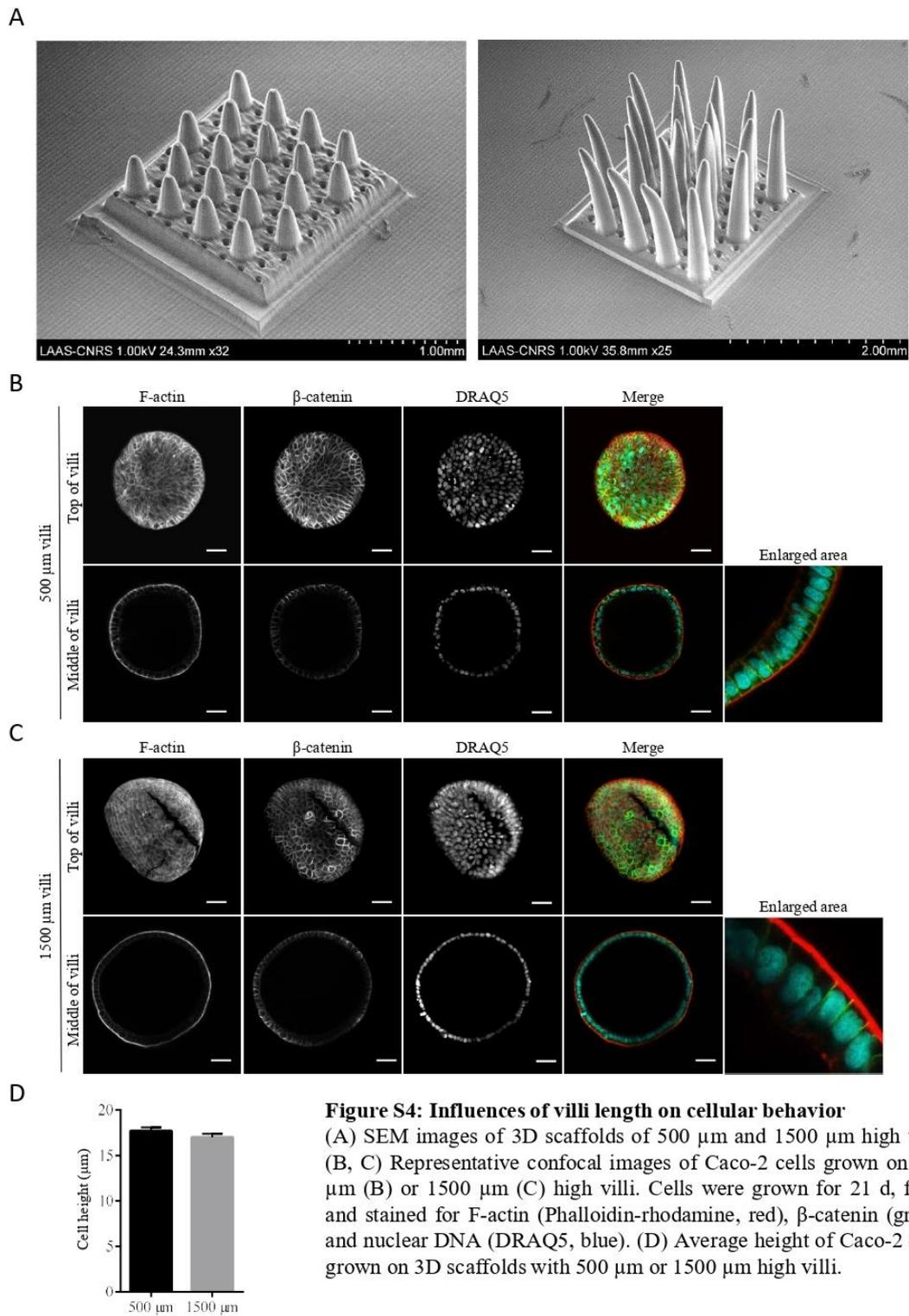


Figure S3: Confirmation of the hydrogel with another colorectal cell line

Representative fluorescence images of Caco-2 cells cultured on various hydrogels. Cells were seeded at 20,000 cells/cm², after 6 days of culture, cells were fixed and stained for F-actin with phalloidin-FITC and nuclear DNA was stained with Hoechst 33342. The bar graph shows the quantification of cells number per field (40X, 4 fields counted). Scale bars = 25 μm.



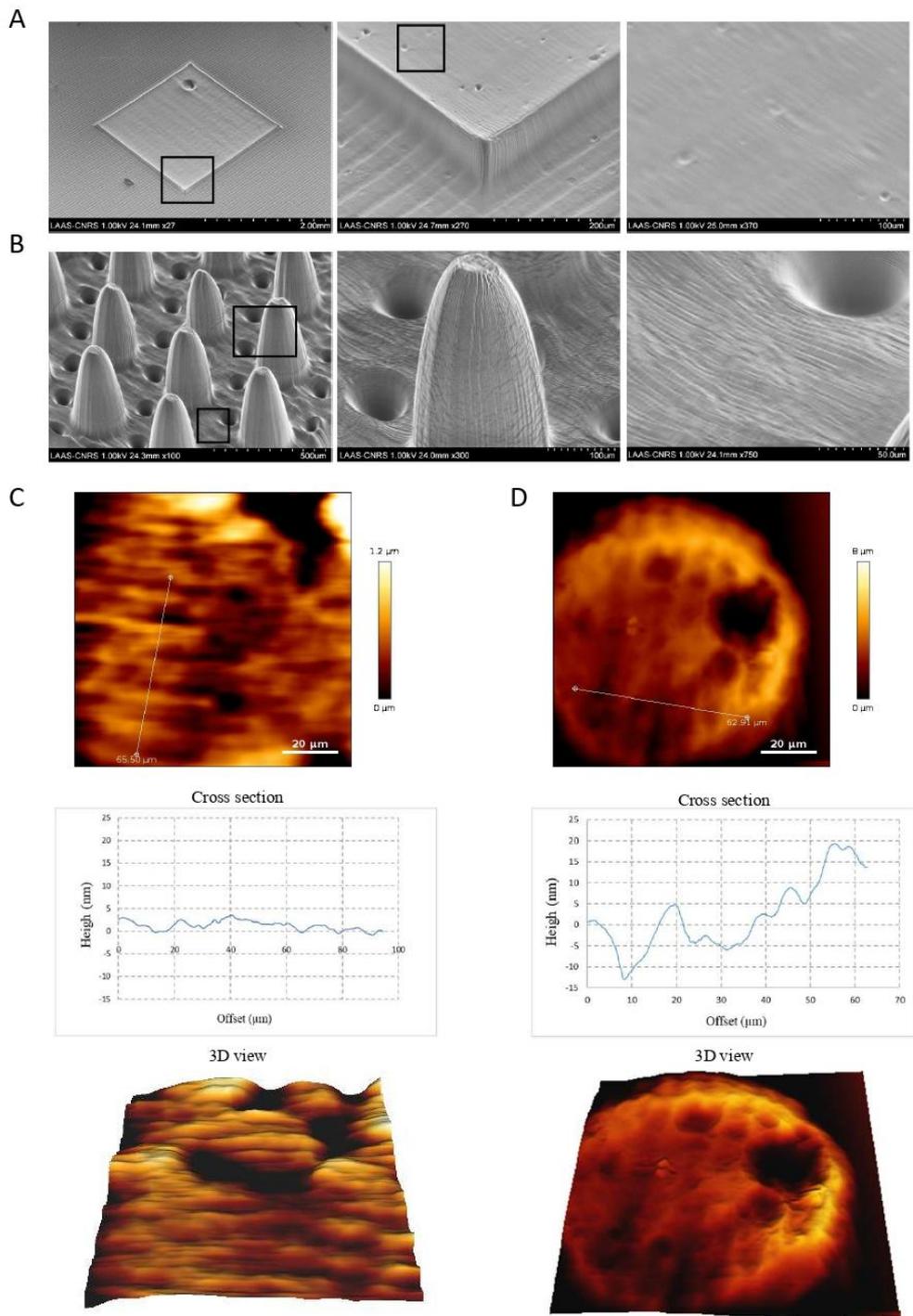


Fig S5: Surface topography and roughness of the hydrogel

(A, B) Representative SEM images of 2D (A) or 3D (B) hydrogels. (C, D) AFM imaging of 2D (C) or 3D (D) hydrogels. Cross section and 3D view is presented for each sample.

Discussion

Les travaux de cette thèse ont porté de façon très générale sur la biologie de l'intestin et sur l'étude des mécanismes impliqués dans la maintenance des cellules souches intestinales. Dans un premier travail de recherche, nous avons pu mettre en évidence une nouvelle fonction de p57 dans les cellules souches intestinales indépendante des complexes cycline/CDK. Dans un deuxième projet, en utilisant une approche interdisciplinaire, nous avons développé un nouveau modèle *in vitro* en 3 dimensions pour la culture et l'étude des cellules souches intestinales et de leurs descendants.

I. Rôle de p57 dans les cellules souches intestinales

Nos travaux indiquent que p57 est exprimé dans les cellules souches +4, identifiées grâce à un marquage Sox9 et un traçage génétique Hopx, et que p57 est requis pour leur maintien en quiescence de façon indépendante des CDK. En effet, selon nos résultats, l'absence de p57 entraîne une augmentation de la prolifération de ces cellules souches de réserve qui sont quiescentes dans des conditions physiologiques (Takeda et al., 2011; Tian et al., 2011).

p57 détermine-t-il le devenir des cellules souches ?

Plusieurs marqueurs identifiant la population de cellules souches +4 ont été décrits, dont Bmi1 (Sangiorgi and Capecchi, 2008), mTert (Montgomery et al., 2011) ou encore Hopx (Takeda et al., 2011). Toutes ces études ont montré, par des expériences de traçage génétique, que dans des conditions de régénération, ces cellules souches +4 sont résistantes aux dommages et capables d'entrer en prolifération afin de régénérer l'épithélium en donnant des progéniteurs qui vont générer les cellules différenciées, mais également en générant des CBC afin de reconstituer le pool de cellules Lgr5^{High} (Takeda et al., 2011 ; Tian et al., 2011). Il a également été montré que les cellules Lgr5^{High} sont capables de donner ces cellules souches +4 Hopx⁺ (Takeda et al., 2011). Il existe donc une relation dynamique et une interconversion possible entre ces deux populations de cellules souches. Cependant, malgré de nombreuses études, l'identité de ces cellules souches de réserve et la nature de leur relation et de la hiérarchie par rapport aux CBC reste discutée.

En effet, il a été montré que les CBC Lgr5^{High} expriment également, à des niveaux moindres, les marqueurs des cellules +4 notamment Bmi1, mTert et Hopx (Itzkovitz et al., 2011; Munoz et al., 2012). En accord avec ces études, nous avons également observé une expression modeste

des marqueurs Hopx et mTert dans les cellules Lgr5^{High}. De plus, une étude a montré que les cellules Lgr5^{High} sont relativement radiorésistantes et peuvent contribuer à la régénération post-dommages, ce qui remet en question le rôle des cellules souches +4 dans la régénération (Hua et al., 2012).

Une hypothèse attractive pour expliquer ces études controversées, est que selon leur statut, certaines cellules +4 expriment également de forts niveaux de Lgr5. En effet, des études réalisées sur les souris Lgr5^{eGFP} ont révélé que certaines cryptes expriment de forts niveaux de GFP dans la région +4/+5, au-dessus de la dernière cellule de Paneth (Barker et al., 2007; Buczacki et al., 2013). Les deux populations de cellules souches seraient alors chevauchantes, et auraient une seule et même origine, les CBC. Dans ce cas, la population de cellules CBC serait en réalité hétérogène, comprenant à la fois des cellules Lgr5^{High} prolifératives mais aussi une fraction de cellules quiescentes, qui exprimeraient alors les marqueurs des cellules souches +4.

Dans ce sens, l'existence d'une population quiescente, exprimant à la fois les marqueurs de CBC et de cellules +4, réconciliant ces deux modèles a récemment été décrite (Barriga et al., 2017; Buczacki et al., 2013). Dans une première étude, une population LRC a été identifiée grâce à une stratégie permettant de marquer génétiquement les LRC par un allèle Cyp1a1-H2B-YFP. (Buczacki et al., 2013). Des cellules YFP-LRC ont ainsi été identifiées, localisées préférentiellement en position +3/+4 exprimant des marqueurs du lignage sécrétoire mais aussi les marqueurs des cellules souches Lgr5, ainsi que les marqueurs des cellules +4 (Buczacki et al., 2013). En accord avec cette possibilité, dans nos expériences, une expression modeste de Lgr5 et Ascl2 dans les cellules Hopx⁺ a été observée. De manière similaire, une population Mex3a^{High} a récemment été identifiée (Barriga et al., 2017). Cette population est principalement localisée en position +3/+4 et, comme les YFP-LRC, exprime à la fois les marqueurs des cellules souches Lgr5^{High} et des cellules souches +4. De manière intéressante, la population Mex3a^{High} est enrichie en gènes codant pour la fonction de sécrétion et présente une forte expression de p57 par rapport aux CBC Lgr5^{High} (Barriga et al., 2017). De plus, les auteurs ont montré que les gènes spécifiquement exprimés dans les YFP-LRC, qui expriment aussi de forts niveaux de Mex3a, sont également significativement enrichies dans cette population Mex3a^{High}, indiquant donc qu'il s'agit de la même population cellulaire qui a été définie comme des CBC quiescentes (Barriga et al., 2017).

La différence majeure entre cette population LRC/Mex3a^{High} et les CBC actives serait donc leur statut de prolifération, qui pourrait être déterminé par p57. En effet, l'absence de p57 entraîne une augmentation de prolifération des cellules Hopx⁺ qui deviendrait alors similaire à des cellules Lgr5^{High}. Un rôle de p57 dans la détermination du destin des cellules souches neurales a récemment été montré chez la drosophile. Au cours du développement, 75% des cellules souches neurales quiescentes sont arrêtées en G₂ et non G₀, ce qui leur confère une cinétique de réponse différente aux stimuli nutritionnels et sont donc distinctes sur le plan fonctionnel (Otsuki and Brand, 2018). Le choix d'orientation entre G₀ et G₂ est déterminé par la présence de Decapo (homologue de p57 chez la drosophile) qui promeut l'entrée en quiescence de type G₀ (Otsuki and Brand, 2019). Il est donc tentant de faire un parallèle avec ce système, et d'émettre l'hypothèse que le choix d'orientation entre les cellules souches CBC actives et les cellules souches +4 est déterminé par la présence de p57, qui favoriserait alors l'orientation vers les cellules souches de réserve et les maintiendrait quiescentes (**Figure 54**).

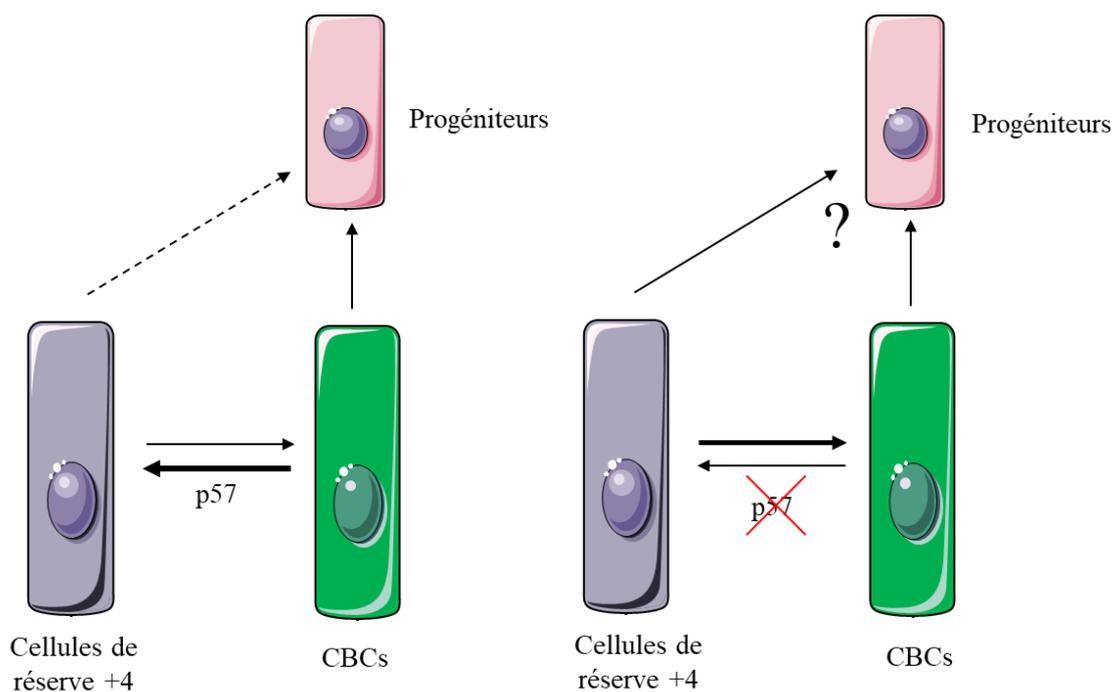


Figure 54 : Hypothèse sur la fonction de p57 dans la détermination du destin des cellules souches

Il a été montré que les cellules souches +4 proviennent des CBC et expriment à la fois les marqueurs des cellules +4 et des CBC. Une possibilité pour expliquer ces observations est que les deux cellules aient la même origine et soient en réalité une seule et même population hétérogène de cellules souches. Le choix de l'orientation au sein de cette population pourrait alors être déterminé par p57.

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de comparer le profil transcriptionnel des cellules souches Hopx⁺ d'embryons p57^{KO} avec des cellules souches issues de souris p57^{WT} et p57^{CK-} en réalisant un RNA-seq sur des cellules GFP triées afin de déterminer l'identité de

ces cellules en absence de p57. Si notre hypothèse est correcte, l'expression des gènes signatures des CBC comme *Lgr5*, *Ascl2* ou *Olfm4* dans les cellules *Hopx*⁺ en l'absence de p57 devrait être augmentée. Ces expériences permettront également d'évaluer l'expression des protéines du cycle cellulaire tel que les cyclines ou PCNA afin de confirmer la sortie de quiescence des cellules souches de réserve en absence de p57.

Nous n'avons pas observé d'augmentation des CBC chez les souris *p57*^{KO}, mais une augmentation du nombre de cellules *Hopx*⁺ et du pool des progéniteurs. Il semblerait donc que les cellules *Hopx*⁺ ne se convertissent pas en CBC mais s'auto-renouvèlent de façon plus importante (division symétrique) et génèrent des progéniteurs (division asymétrique). Afin de confirmer l'origine de ces progéniteurs (CBC ou cellules *Hopx*⁺) il serait intéressant de réaliser des expériences de traçage génétique des cellules *Hopx* en absence de p57. Pour cela, nous croiserons des souris *p57*^{flox/flox} avec des souris *Hopx*^{CreERT};R26^{Tomato} afin d'abolir l'expression de p57 spécifiquement dans ces cellules et de suivre les cellules *Hopx* et leurs descendants via l'expression du marqueur fluorescent Tomato par histologie et cytométrie en flux après induction de la recombinaison par le tamoxifène. Il serait également intéressant d'évaluer si l'augmentation des progéniteurs résulte d'un retard de différenciation ou bien d'une augmentation de leur prolifération. Pour cela, nous pouvons effectuer des co-marquage *Id1*/PCNA ou *Id1*/Ki67 sur des coupes d'embryons *p57*^{WT}, *p57*^{KO} et *p57*^{CK-}. Une augmentation du nombre de cellules doublement positives indiquerait alors que l'augmentation des progéniteurs résulte d'une augmentation de leur prolifération.

Les croisements de souris *p57*^{flox/flox} nous permettraient également d'étudier l'effet de la perte de p57 sur le long terme chez l'adulte, ce qui n'a jamais été étudié dans l'intestin du fait de la létalité périnatale des souris *p57*^{KO}. Cette approche permettrait potentiellement de révéler des phénotypes différents. Par exemple, dans les cellules souches neurales, la perte de p57 à court terme entraîne une augmentation de leur prolifération (Furutachi et al., 2013). Cependant sur le long terme, l'augmentation de prolifération, due à l'absence de p57, cause un épuisement des cellules souches et un défaut de neurogénèse (Furutachi et al., 2013). Il serait donc intéressant d'étudier si un mécanisme similaire se produit dans l'intestin et d'évaluer l'effet de la perte de p57 sur long terme dans les cellules souches *Hopx*⁺, et si il y a un épuisement de ce pool de cellules de réserve ce qui pourrait engendrer des défauts de régénération tissulaire.

Les résultats obtenus sur les souris mutantes $p57^{CK-}$ suggèrent que cette fonction de p57 est indépendante de l'inhibition du cycle cellulaire. La réalisation d'un RNA-seq sur les cellules souches $Hopx^+$ des embryons $p57^{KO}$ permettra également de confirmer le mécanisme moléculaire que nous avons mis en évidence en étudiant le profil d'expression des gènes cibles d'Ascl2 dans les cellules $Hopx^+$ en fonction du statut de p57, ou bien de mettre en évidence un autre mécanisme moléculaire.

Mécanisme moléculaire par lequel p57 contrôle les cellules souches intestinales

Au cours de cette étude, nous avons identifié une nouvelle fonction de p57 en qualité de répresseur transcriptionnel. Nous avons montré que p57 est capable de lier et d'inhiber l'activité d'Ascl2 de façon directe, en se fixant sur les promoteurs cibles d'Ascl2 avec un complexe co-répresseur formé notamment de HDAC7 et mSin3a. Il serait intéressant d'étudier le rôle de p57 dans ce complexe, et notamment de savoir si p57 est nécessaire à son recrutement. En effet, il a été montré que p27, un autre inhibiteur de la famille Cip/Kip, participe au recrutement de mSin3a et d'HDAC1 sur le complexe p130/E2F4 sur ses promoteurs cibles afin d'inhiber leur transcription (Pippa et al., 2012). Cette même étude a également montré que p27 est capable de réguler la transcription de nombreux gènes de manière dépendante et indépendante des CDK (Pippa et al., 2012). Afin de vérifier si p57 est nécessaire au recrutement du complexe répresseur, il est possible de réaliser des CHIP dans des cellules SW480 après transfection d'un siRNA dirigé contre p57. Il serait également intéressant de réaliser un CHIP-Seq afin d'identifier l'ensemble des gènes cibles de p57 et d'identifier de nouveaux gènes possiblement impliqués dans la régulation des cellules souches intestinales.

Nous proposons que la présence de p57 permettrait de maintenir l'identité des cellules souches +4 en inhibant l'activité d'Ascl2. Initialement, la présence d'Ascl2 a été détectée uniquement dans les CBC et non dans les cellules souches +4 (van der Flier et al., 2009b). Nous avons néanmoins détecté une faible expression d'Ascl2 dans les cellules souches $Hopx^+$ triées (augmentation de 1,8 +/- 0,5 par rapport aux cellules GFP négative). Il est possible que p57 inhibe également l'expression d'Ascl2, puisque ce dernier est capable de réguler sa propre expression afin de renforcer l'identité des cellules souches (Schuijers et al., 2015). Au niveau des progéniteurs, l'inhibition d'Ascl2 permettrait d'engager les cellules vers la différenciation et de limiter leur prolifération ce qui est cohérent avec l'augmentation du pool de progéniteurs observée chez les souris $p57^{KO}$.

Une autre possibilité est qu'en plus de l'inhibition d'Ascl2, p57 agissent via un autre mécanisme pour le maintien des cellules souches +4, et notamment via Hes1. En effet, des données préliminaires montrent une augmentation de l'expression de Hes1 dans les cryptes des souris p57^{KO} (**Figure 55**). L'interaction entre p57 et Hes1 a également été montrée entre les protéines endogènes par co-immunoprécipitation dans des cellules HEK 293 (**Figure 55**). Comme décrit dans l'introduction, Hes1 est impliqué dans le choix du lignage absorptif/sécrétoire, or nous n'avons observé aucun défaut de différenciation des cellules épithéliales, il est donc nécessaire de confirmer cette augmentation d'expression de Hes1 sur un nombre plus important d'animaux. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de l'interaction entre Hes1 et p57 sur l'activité transcriptionnelle de Hes1 en réalisant un Transcription Reporter Assay. Enfin, il serait aussi intéressant d'évaluer l'expression de Atoh1, cible de Hes1, selon le statut de p57. En effet, de manière similaire à Ascl1, p57 est capable d'interagir avec Atoh2 dans les progéniteurs neuraux, cependant à ma connaissance l'effet de cette interaction n'a pas été testé (Joseph et al., 2009).

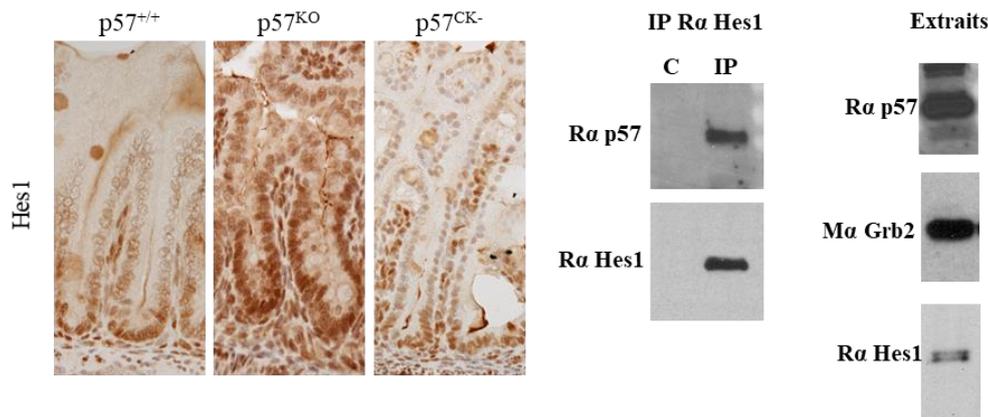


Figure 55 : p57 module l'expression de Hes1 ?

Immunohistochimie (marron) contre Hes1 sur des coupes intestinales de souris p57^{WT}, p57^{KO} ou p57^{CK-}. Co-immunoprécipitation Hes1/p57, Hes1 a été immunoprécipité dans des cellules HEK 293 et la présence de p57 a été observé par western-blot.

En plus de sa fonction dans la détermination du lignage, Hes1 stimule également la prolifération des cellules souches intestinales dans la crypte via la répression de p57 et p27 dans ce compartiment (Riccio et al., 2008). p57 pourrait ainsi être impliqué dans une boucle de rétrocontrôle négatif afin de limiter l'expansion des cellules souches et des progéniteurs en réprimant l'expression de facteurs de transcription comme Ascl2 et Hes1.

Enfin, la kinase GSK3 β a été identifiée comme partenaire potentiel de p57 dans l'interactome réalisé au sein de l'équipe (Duquesnes et al., 2016). GSK3 β fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine et inhibe donc la voie Wnt, principal moteur de la

prolifération des cellules souches intestinales. Il serait donc intéressant de valider cette interaction par co-immunoprécipitation et de réaliser des marquages histologiques contre β -caténine afin d'observer si la signalisation Wnt est altérée en fonction du statut de p57.

En résumé, malgré l'identification d'une nouvelle fonction de p57, il reste de nombreux points à éclaircir, et il est possible voire probable que plusieurs mécanismes indépendants soient impliqués et que p57 agissent à plusieurs niveaux afin de participer à la maintenance de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

p57 : suppresseur de tumeur dans l'intestin ?

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus commun et la quatrième cause de décès par cancer dans le monde, représentant environ 1,2 millions de nouveaux cas et 600 000 décès par an. L'incidence est faible chez les personnes de moins de 50 ans, mais augmente fortement avec l'âge (Brenner et al., 2014). La plupart des patients présentent une dérégulation de la signalisation Wnt, et notamment des mutations du gène APC, qui sont la principale cause de la forme héréditaire de cancer colorectal (Cancer Genome Atlas, 2012 ; Fearnhead et al., 2001). La progression des adénomes en cancers métastatique est ensuite accompagnée de mutations additionnelles de gènes tels que K-Ras, p53 ou Smad4 (Rizk and Barker, 2012).

De par sa fonction de régulateur négatif du cycle cellulaire, p57 est un potentiel gène suppresseur de tumeur. Cependant, la létalité périnatale des souris p57^{KO} n'a pas permis jusqu'à présent d'étudier cette fonction *in vivo*, et cela n'a pas encore été étudié dans les souris p57^{KO} conditionnelles (p57^{ckO}). Néanmoins, p57 est un marqueur pronostique dans de nombreux types de cancers et notamment dans le cancer colorectal (Kavanagh and Joseph, 2011 ; Kikuchi et al., 2002; Li et al., 2003). En effet, une forte diminution d'expression de p57 a été observée dans les cancers colorectaux (Li et al., 2003). La perte d'expression de p57 est principalement causée par hyperméthylation de son promoteur (Kikuchi et al., 2002). En effet, il a été montré que l'expression de la méthyltransférase Dnmt3a est fortement augmentée dans le cancer du côlon. De façon cohérente, sa délétion inhibe la formation de tumeurs *in vivo* au moins en partie par l'augmentation de l'expression de p57 due à l'hypométhylation de son promoteur (Weis et al., 2015). Il semble donc important d'évaluer le rôle suppresseur de tumeur de p57 dans les cancers colorectaux *in vivo*.

Afin d'évaluer l'effet de p57 sur la tumorigénèse intestinale, nous utiliserons les souris p57 knock-out conditionnelles (Mademtoglou et al., 2017). Ces souris p57^{CKO} pourront être croisées avec des souris Lgr5^{+CreERT} (Barker et al., 2007) ou Hopx^{CreERT} (Takeda et al., 2011) afin d'abolir l'expression de p57 spécifiquement dans les deux types de cellules souches (**Figure 55**). Dans un premier temps, la tumorigénèse sera induite par un modèle de traitement chimique AOM-DSS. L'AOM (azoxyméthane) est un agent génotoxique induisant la génération spontanée de tumeurs du colon. La combinaison d'un traitement AOM par injection intrapéritonéale avec l'agent inflammatoire DSS (Dextran Sodium Sulfate) dans l'eau de boisson, entraîne une accélération de l'apparition des tumeurs et permet d'observer de multiples tumeurs au niveau du colon environ 10 semaines après traitement (De Robertis et al., 2011). La présence de LacZ dans l'allèle p57^{CKO} permettra également d'évaluer le taux de recombinaison et de suivre les cellules recombinées et leurs descendants par marquage β-galactosidase.

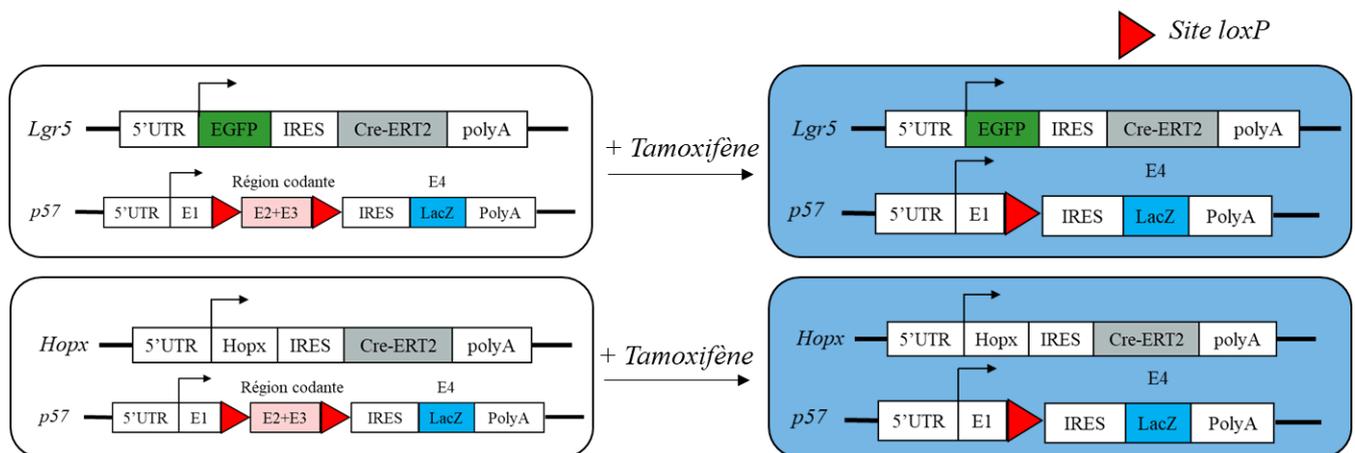


Figure 56 : Délétion de p57 spécifiquement dans les cellules souches

L'utilisation du modèle de souris p57^{CKO} et des souris reportrices Lgr5 et Hopx Cre permettra la délétion de p57 spécifiquement dans les cellules souches. Suite à la recombinaison, l'induction de la carcinogénèse par un traitement chimique nous permettra d'évaluer le rôle de p57 en tant que suppresseur de tumeur.

Une deuxième approche est l'utilisation du modèle de souris $Apc^{flox\Delta e1-15}$. La recombinaison par la recombinaise Cre entraîne la délétion totale d'Apc ce qui induit un développement spontané de multiples adénomes semblables à ceux observés chez l'homme (Cheung et al., 2010). Ces souris seront ensuite croisées avec les souris $Lgr5^{+/CreERT}$ ou $Hopx^{CreERT}$ avec ou sans l'allèle $p57^{cKO}$ (Figure 57). Ces croisements permettront d'abolir l'expression d'Apc et/ou p57 spécifiquement dans les cellules souches intestinales. La comparaison du développement de tumeurs en présence ou en absence de p57 permettra ainsi d'évaluer le rôle de p57 dans la tumorigénèse intestinale.

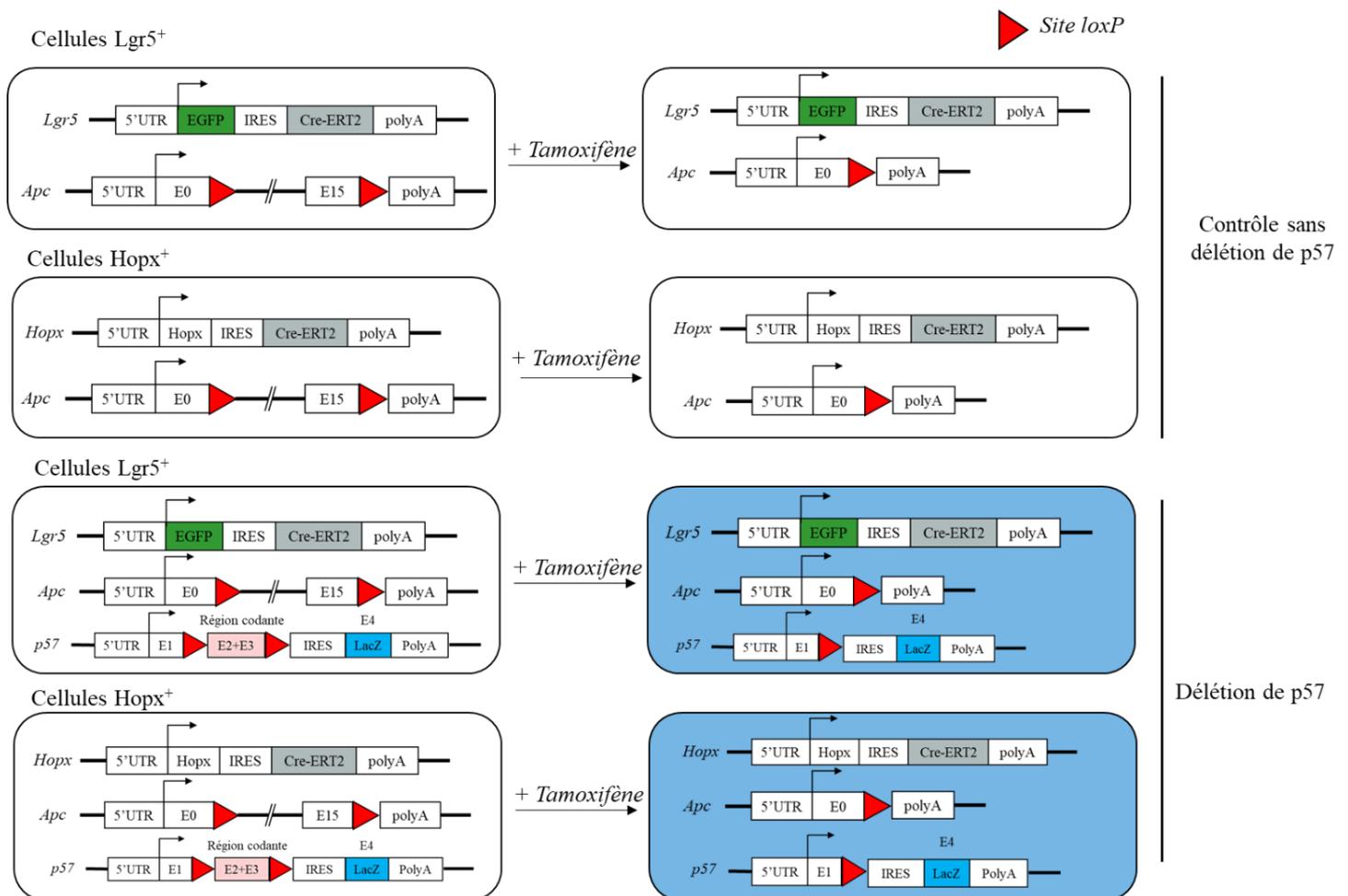


Figure 57 : Etude du rôle de p57 dans la tumorigénèse intestinale par croisement avec les souris Apc

Une deuxième approche pour évaluer le rôle de p57 dans la tumorigénèse est l'utilisation du modèle de souris $Apc^{flox\Delta e1-15}$ qui développe spontanément des adénomes après recombinaison. Ces modèles nous permettront d'abolir simultanément l'expression d'Apc et de p57 ou bien d'Apc seulement dans les cellules souches intestinales.

En conclusion, ces travaux ont mis en évidence une nouvelle fonction de p57 dans les cellules souches intestinales pendant le développement. Ce rôle de p57 dans la régulation des

cellules souches pourrait être transposé dans un contexte de tumorigénèse et pourrait expliquer le rôle suppresseur de tumeur supposé de p57 dans la carcinogénèse intestinale. Il reste cependant de nombreux points à investiguer, notamment sur le plan moléculaire.

II. Développement d'un nouveau modèle de culture en 3D

A l'heure actuelle, le modèle *in vitro* le plus couramment utilisé pour l'étude des cellules souches intestinales est la culture d'organoïdes. Ce système permet de récapituler certains aspects de l'organisation et de l'hétérogénéité tissulaire. Cependant ces systèmes présentent également un certain nombre de limites, notamment l'absence de topographie 3D et le faible contrôle de l'organisation 3D des cellules, l'absence de gradient biochimique ou encore le faible taux de reproductibilité liée entre autre à l'utilisation du Matrigel. Dans ce contexte, nous avons développé un nouveau modèle *in vitro* par l'utilisation d'un scaffold imprimé en trois dimensions. Afin de réaliser une preuve de concept, dans cette étude, le modèle a été développé en utilisant la lignée de cellules cancéreuses colorectales Caco-2 et les scaffolds ont été réalisés dans un matériau unique et les cellules cultivées dans un environnement uniforme.

Les cellules Caco-2 représentent un modèle pratique et facile à mettre en œuvre pour l'étude de l'épithélium intestinal. Cependant, il est certain que ce modèle de cellules cancéreuses présente des limites et ne reflète pas la physiologie *in vivo*. En effet, tous les types cellulaires de l'épithélium ne sont pas représentés, de plus les différents récepteurs, transporteurs ou enzymes ne sont pas exprimés de la même façon dans les Caco-2 et dans les cellules primaires (Dutton et al., 2019). Ainsi, afin de reproduire de façon fidèle l'épithélium intestinal il serait donc nécessaire de travailler avec des cellules primaires.

Comme décrit précédemment (p.102), des cellules intestinales primaires ont déjà été cultivées dans des hydrogels de type PEG, on peut donc supposer que le matériau développé à base d'un mélange de PEG-DA/acide acrylique permettra la culture de cellules intestinales primaires. Ces études ont montré que, sur ce même type de matériau, une matrice de rigidité de 1,3 kPa était optimale pour la prolifération des cellules souches intestinales, alors qu'une matrice moins rigide et dégradable était nécessaire à la différenciation et à la formation des organoïdes (Cruz-Acuna et al., 2017 ; Gjorevski et al., 2016). De plus, il a été montré que la culture en 2D sur des surfaces rigides, telles que le polystyrène ou le PDMS, ne permet pas la survie et la croissance de cryptes intestinales murines (Wang et al., 2017a). Ceci est probablement dû aux propriétés mécaniques des supports, puisque le dépôt de matrice comme le Matrigel ou la laminine sur ces supports n'améliore pas la survie cellulaire (Wang et al.,

2017a). En revanche, des gels de collagène de type 1, beaucoup moins rigides supportent la prolifération des cellules souches intestinales (**Figure 58**) (Wang et al., 2017a). Il semblerait donc qu'une matrice possédant une rigidité de l'ordre du kPa soit optimale pour la culture des cellules souches intestinales.

Il y a encore peu d'études rapportant des valeurs de rigidité *in vivo* du fait des difficultés techniques à effectuer ces mesures. Cependant des mesures par un microindenteur ont été réalisées sur des fragments d'intestin humain *ex vivo* non fixés, et il a été montré que la matrice intestinale saine possède un module de Young de 2,9 kPa contre 16 kPa pour des intestins de patient atteints de la maladie de Crohn ce qui suggère un remodelage important de la matrice en cas d'inflammation (Johnson et al., 2013). Il est cependant possible que ces mesures sous-estiment la valeur réelle de rigidité du tissu puisque les mesures ont été faites *ex vivo* et donc sans la contraction des couches musculaires sous-jacentes qui peuvent rigidifier la muqueuse.

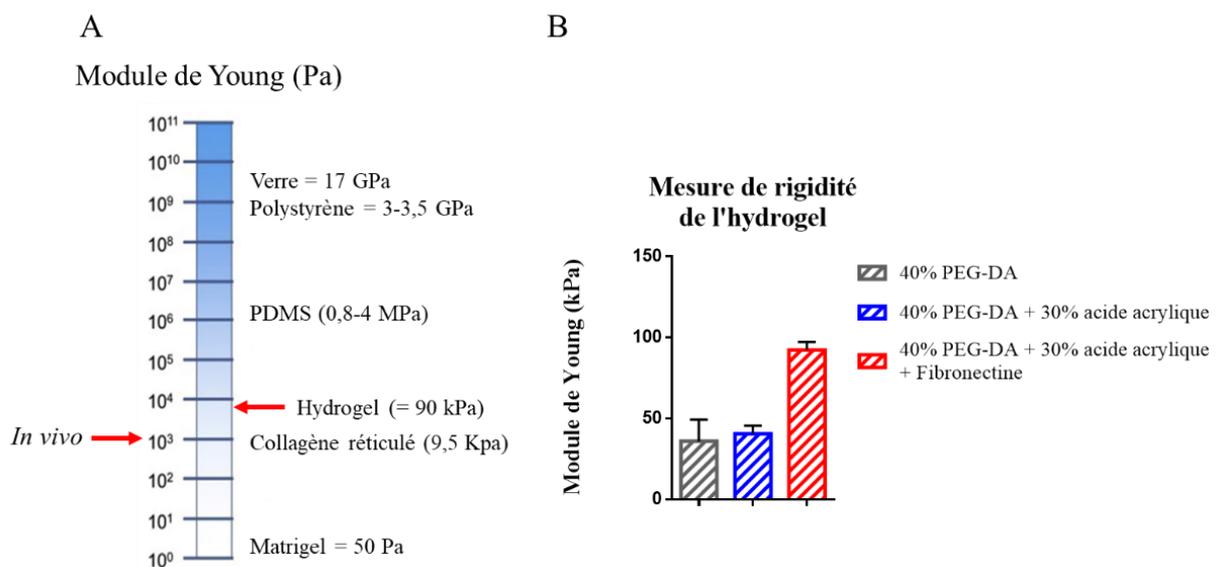


Figure 58 : Propriétés mécaniques de l'hydrogel

(A) Echelle de grandeur des rigidités connues de différents substrats. D'après de Wang et al, 2017

(B) Module de Young mesuré par microscopie à force atomique des hydrogels de PEG-DA.

Des mesures de microscopie à force atomique indiquent que le module de Young de notre hydrogel (40% PEG-DA + 30% acide acrylique + Fibronectine 250 µg/mL) est de l'ordre de 90 kPa (**Figure 58**). Il sera donc nécessaire de modifier la composition de l'hydrogel afin de diminuer la rigidité du support, soit en diminuant la quantité de polymère présent dans l'hydrogel, soit en utilisant des PEG à chaînes plus longues (PEG-DA 2400), ou encore en modifiant les chaînes de PEG afin de le rendre dégradable. De manière intéressante nos

résultats de microscopie à force atomique montrent également que la présence de fibronectine dans l'hydrogel augmente fortement sa rigidité, ce qui a déjà été décrit dans la littérature (Gildner et al., 2004). Cette propriété de la fibronectine à augmenter la rigidité pourrait ainsi participer à l'augmentation du module de Young observée chez les patients atteints de pathologies inflammatoires où une augmentation du dépôt de fibronectine a été décrite (Petrey and de la Motte, 2017).

Comme décrit dans l'introduction, la matrice extracellulaire varie le long de l'axe crypte/villosité et la fibronectine est majoritairement retrouvée au niveau de la crypte, alors que dans les villosités on retrouve du collagène et des laminines $\alpha 3$ et $\alpha 5$ (Meran et al., 2017). Ce gradient de matrice suggère donc un gradient de rigidité le long de l'axe, avec une matrice plus rigide au niveau des cryptes due à la présence de fibronectine et qui décroît progressivement vers les villosités. Cette hypothèse est cohérente avec les observations réalisées sur les organoïdes cultivés dans des hydrogels de PEG, où une diminution de la rigidité est nécessaire à la différenciation des cellules primaires (Gjorevski et al., 2016). Il serait donc intéressant de mesurer la rigidité de notre hydrogel avec d'autres matrices que la fibronectine (collagène 1 et laminine) pour confirmer ces variations de rigidité en fonction des protéines de la matrice extracellulaire. Les protéines de la matrice extracellulaire ne fournissent pas uniquement des informations mécaniques mais apportent aussi des signaux biochimiques, il serait donc dans tous les cas important d'intégrer ce gradient de matrice en imprimant des scaffolds multimatériaux, ce qui est possible en changeant le réservoir du matériau au cours de l'impression.

Afin de récapituler complètement le microenvironnement intestinal il est nécessaire d'intégrer d'autres composants et notamment le gradient de facteurs de croissance. En effet, il a été montré par ensemencement de cellules intestinales primaires sur des scaffolds de collagène que la présence de ces gradients inverses de facteurs de croissance est nécessaire à la polarisation des cellules en compartiments prolifératif et différencié (Wang et al., 2017b). L'application de forces mécaniques mimant le péristaltisme et les forces de cisaillement générées par le flux ont également été montrées comme favorisant la différenciation cellulaire et l'organisation spatiale (Kasendra et al., 2018).

Afin d'intégrer ces composants dans notre système, il serait intéressant d'incorporer les scaffolds dans un système microfluidique similaire au système Gut-On-Chip précédemment

décrit (Kim et al., 2012a), composé de deux canaux séparés par une membrane de PDMS poreuse et extensible (**Figure 59**).

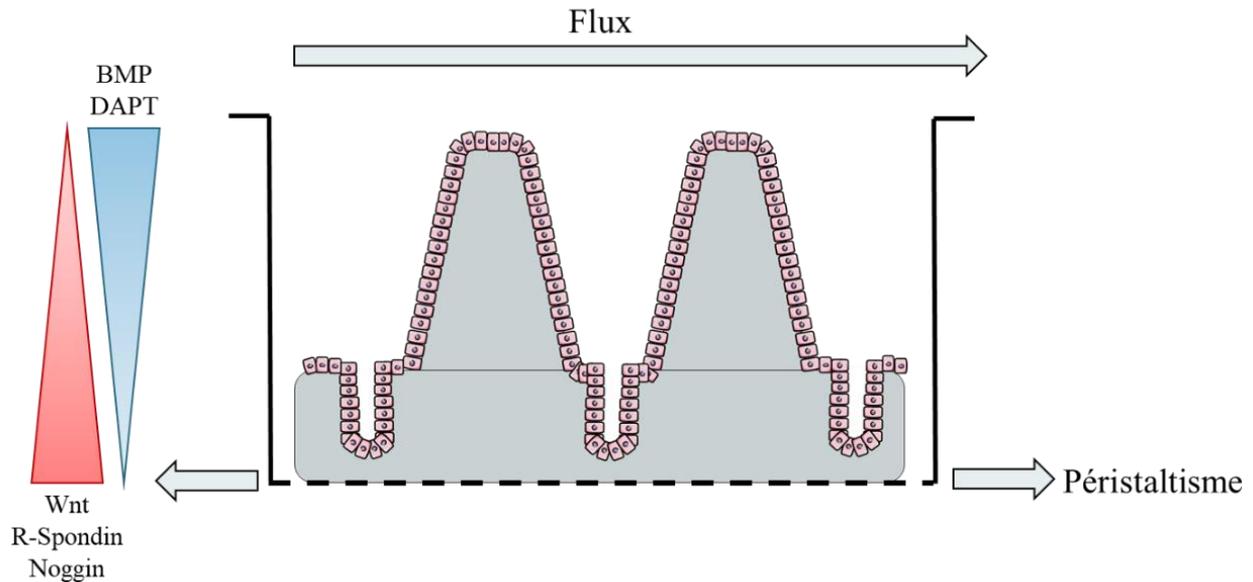


Figure 59 : Intégration du scaffold dans un système microfluidique

L'insertion du scaffold dans un système microfluidique permettrait d'introduire des gradients de facteurs de croissance ainsi que d'appliquer des contraintes mécaniques afin de mimer le microenvironnement.

La porosité de la membrane de PDMS offrirait la possibilité de recréer les gradients inverses de facteurs de croissance par simple diffusion, en introduisant au niveau de la chambre basale des facteurs pro-prolifératifs (Wnt, R-spondin et Noggin) et dans la chambre supérieure des facteurs nécessaires à la différenciation tels que le DAPT (inhibiteur de la voie Notch) et des BMP. Le renouvellement constant du milieu par le système microfluidique nous permettrait de maintenir ce gradient stable. Cette configuration offrirait également la possibilité d'étudier le transport de molécule à travers l'épithélium. Le flux peut être facilement contrôlé en perfusant le milieu de culture dans la chambre supérieure alors que le péristaltisme pourrait être mimé en appliquant une pression au niveau de la chambre inférieure ce qui permettrait de déformer la membrane de PDMS et donc d'étirer le scaffold et les cellules. Ce système permettrait de coupler la reproduction de l'architecture tridimensionnelle avec l'application de contraintes mécaniques et la présence de gradient biochimiques, ce qui n'a pas été étudié jusqu'à présent à notre connaissance.

En conclusion, ce nouveau modèle de culture en 3 dimensions représente un outil prometteur pour l'étude des cellules souches intestinales et de leur descendance malgré les différents aspects qu'il reste à améliorer. Cette étude a également montré la faisabilité et l'intérêt de l'impression 3D pour le développement de modèles de culture de topologie contrôlée. Ce type de système représente un outil puissant pour les tests *in vitro* de molécules thérapeutiques mais également pour les études de mécanismes fondamentaux. En effet, il serait intéressant d'étudier le rôle de p57 sur ce modèle en ensemençant des cellules intestinales primaires issues de souris p57^{WT}, p57^{KO} ou p57^{CK-} sur les scaffolds.

Références Bibliographiques

- Abaci, H.E., Gledhill, K., Guo, Z., Christiano, A.M., and Shuler, M.L. (2015). Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents. *Lab Chip* 15, 882-888.
- Accardo, A., Blatche, M.C., Courson, R., Loubinoux, I., Thibault, C., Malaquin, L., and Vieu, C. (2017). Multiphoton Direct Laser Writing and 3D Imaging of Polymeric Freestanding Architectures for Cell Colonization. *Small* 13.
- Adkins, J.N., and Lumb, K.J. (2002). Intrinsic structural disorder and sequence features of the cell cycle inhibitor p57Kip2. *Proteins* 46, 1-7.
- Adnane, J., Jackson, R.J., Nicosia, S.V., Cantor, A.B., Pledger, W.J., and Sebt, S.M. (2000). Loss of p21WAF1/CIP1 accelerates Ras oncogenesis in a transgenic/knockout mammary cancer model. *Oncogene* 19, 5338-5347.
- Annabi, N., Tamayol, A., Uquillas, J.A., Akbari, M., Bertassoni, L.E., Cha, C., Camci-Unal, G., Dokmeci, M.R., Peppas, N.A., and Khademhosseini, A. (2014). 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 26, 85-123.
- Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C.L., Golson, M.L., Zahm, A.M., Ray, M., Wiser, C.L., Wright, C.V., *et al.* (2016). Foxl1-expressing mesenchymal cells constitute the intestinal stem cell niche. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2, 175-188.
- Arboleda, V.A., Lee, H., Parnaik, R., Fleming, A., Banerjee, A., Ferraz-de-Souza, B., Delot, E.C., Rodriguez-Fernandez, I.A., Braslavsky, D., Bergada, I., *et al.* (2012). Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat Genet* 44, 788-792.
- Arcaute, K., Mann, B.K., and Wicker, R.B. (2006). Stereolithography of three-dimensional bioactive poly(ethylene glycol) constructs with encapsulated cells. *Ann Biomed Eng* 34, 1429-1441.
- Asfaha, S., Hayakawa, Y., Muley, A., Stokes, S., Graham, T.A., Ericksen, R.E., Westphalen, C.B., von Burstin, J., Mastracci, T.L., Worthley, D.L., *et al.* (2015). Krt19(+)/Lgr5(-) Cells Are Radioresistant Cancer-Initiating Stem Cells in the Colon and Intestine. *Cell Stem Cell* 16, 627-638.
- Ashton, G.H., Morton, J.P., Myant, K., Phesse, T.J., Ridgway, R.A., Marsh, V., Wilkins, J.A., Athineos, D., Muncan, V., Kemp, R., *et al.* (2010). Focal adhesion kinase is required for intestinal regeneration and tumorigenesis downstream of Wnt/c-Myc signaling. *Dev Cell* 19, 259-269.
- Ayyaz, A., Kumar, S., Sangiorgi, B., Ghoshal, B., Gosio, J., Ouladan, S., Fink, M., Barutcu, S., Trcka, D., Shen, J., *et al.* (2019). Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell. *Nature*.
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., *et al.* (2014). YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 158, 157-170.
- Bakker, E.R., Raghoebir, L., Franken, P.F., Helvensteijn, W., van Gorp, L., Meijlink, F., van der Valk, M.A., Rottier, R.J., Kuipers, E.J., van Veelen, W., *et al.* (2012). Induced Wnt5a expression perturbs embryonic outgrowth and intestinal elongation, but is well-tolerated in adult mice. *Dev Biol* 369, 91-100.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 19-33.
- Barker, N., and Clevers, H. (2007). Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology* 133, 1755-1760.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.

Barriga, F.M., Montagni, E., Mana, M., Mendez-Lago, M., Hernando-Momblona, X., Sevillano, M., Guillaumet-Adkins, A., Rodriguez-Esteban, G., Buczacki, S.J.A., Gut, M., *et al.* (2017). Mex3a Marks a Slowly Dividing Subpopulation of Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Stem Cell* *20*, 801-816 e807.

Barry, E.R., Morikawa, T., Butler, B.L., Shrestha, K., de la Rosa, R., Yan, K.S., Fuchs, C.S., Magness, S.T., Smits, R., Ogino, S., *et al.* (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* *493*, 106-110.

Bart, J., Tiggelaar, R., Yang, M., Schlautmann, S., Zuilhof, H., and Gardeniers, H. (2009). Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab Chip* *9*, 3481-3488.

Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., van Oudenaarden, A., and Clevers, H. (2017). Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell* *20*, 177-190 e174.

Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., Bibeau, F., Scherer, G., Joubert, D., Hollande, F., *et al.* (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* *178*, 635-648.

Battle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., van den Born, M.M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., *et al.* (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* *111*, 251-263.

Beaulieu, J.F. (1992). Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* *102 (Pt 3)*, 427-436.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* *382*, 638-642.

Bellis, J., Duluc, I., Romagnolo, B., Perret, C., Faux, M.C., Dujardin, D., Formstone, C., Lightowler, S., Ramsay, R.G., Freund, J.N., *et al.* (2012). The tumor suppressor Apc controls planar cell polarities central to gut homeostasis. *J Cell Biol* *198*, 331-341.

Benoit, Y.D., Lussier, C., Ducharme, P.A., Sivret, S., Schnapp, L.M., Basora, N., and Beaulieu, J.F. (2009). Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol Cell* *101*, 695-708.

Benoit, Y.D., Pare, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F., and Beaulieu, J.F. (2010). Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *298*, G504-517.

Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* *39*, 1071-1076.

Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* *14*, 159-169.

Bhatia, S.N., and Ingber, D.E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* *32*, 760-772.

Bissell, D.M., and Tilles, J.G. (1971). Morphology and function of cells of human embryonic liver in monolayer culture. *J Cell Biol* *50*, 222-231.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (1981a). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat* *160*, 51-63.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (1981b). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucous cells in the adult mouse. *Am J Anat* *160*, 77-91.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* *116*, 7-14.

- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12497-12502.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2010). Cell Lineage metastability in Gfi1-deficient mouse intestinal epithelium. *Dev Biol* *345*, 49-63.
- Bjerknes, M., Khandanpour, C., Moroy, T., Fujiyama, T., Hoshino, M., Klisch, T.J., Ding, Q., Gan, L., Wang, J., Martin, M.G., *et al.* (2012). Origin of the brush cell lineage in the mouse intestinal epithelium. *Dev Biol* *362*, 194-218.
- Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.N., Clevers, H., and Jay, P. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* *166*, 37-47.
- Blondel, D., and Lutolf, M.P. (2019). Bioinspired Hydrogels for 3D Organoid Culture. *Chimia (Aarau)* *73*, 81-85.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 678-689.
- Breault, D.T., Min, I.M., Carlone, D.L., Farilla, L.G., Ambruzs, D.M., Henderson, D.E., Algra, S., Montgomery, R.K., Wagers, A.J., and Hole, N. (2008). Generation of mTert-GFP mice as a model to identify and study tissue progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 10420-10425.
- Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet* *383*, 1490-1502.
- Brioude, F., Lacoste, A., Netchine, I., Vazquez, M.P., Auber, F., Audry, G., Gauthier-Villars, M., Brugieres, L., Gicquel, C., Le Bouc, Y., *et al.* (2013a). Beckwith-Wiedemann syndrome: growth pattern and tumor risk according to molecular mechanism, and guidelines for tumor surveillance. *Horm Res Paediatr* *80*, 457-465.
- Brioude, F., Netchine, I., Praz, F., Le Jule, M., Calmel, C., Lacombe, D., Edery, P., Catala, M., Odent, S., Isidor, B., *et al.* (2015). Mutations of the Imprinted CDKN1C Gene as a Cause of the Overgrowth Beckwith-Wiedemann Syndrome: Clinical Spectrum and Functional Characterization. *Hum Mutat* *36*, 894-902.
- Brioude, F., Oliver-Petit, I., Blaise, A., Praz, F., Rossignol, S., Le Jule, M., Thibaud, N., Faussat, A.M., Tauber, M., Le Bouc, Y., *et al.* (2013b). CDKN1C mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. *J Med Genet* *50*, 823-830.
- Brown, X.Q., Ookawa, K., and Wong, J.Y. (2005). Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response. *Biomaterials* *26*, 3123-3129.
- Buczacki, S.J., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R., and Winton, D.J. (2013). Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* *495*, 65-69.
- Bursac, N., Parker, K.K., Iravanian, S., and Tung, L. (2002). Cardiomyocyte cultures with controlled macroscopic anisotropy: a model for functional electrophysiological studies of cardiac muscle. *Circ Res* *91*, e45-54.
- Busanello, A., Battistelli, C., Carbone, M., Mostocotto, C., and Maione, R. (2012). MyoD regulates p57kip2 expression by interacting with a distant cis-element and modifying a higher order chromatin structure. *Nucleic Acids Res* *40*, 8266-8275.
- Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R.F., Maitra, A., and Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev* *24*, 2383-2388.
- Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2007). YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol* *17*, 2054-2060.
- Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* *487*, 330-337.

Castano, A.G., Garcia-Diaz, M., Torras, N., Altay, G., Comelles, J., and Martinez, E. (2019). Dynamic photopolymerization produces complex microstructures on hydrogels in a moldless approach to generate a 3D intestinal tissue model. *Biofabrication* *11*, 025007.

Castillo-Azofeifa, D., Fazio, E.N., Nattiv, R., Good, H.J., Wald, T., Pest, M.A., de Sauvage, F.J., Klein, O.D., and Asfaha, S. (2019). Atoh1(+) secretory progenitors possess renewal capacity independent of Lgr5(+) cells during colonic regeneration. *EMBO J* *38*.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* *395*, 604-608.

Cervantes, S., Yamaguchi, T.P., and Hebrok, M. (2009). Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice. *Dev Biol* *326*, 285-294.

Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N., and Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* *15*, 2682-2688.

Chan, V., Zorlutuna, P., Jeong, J.H., Kong, H., and Bashir, R. (2010). Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation. *Lab Chip* *10*, 2062-2070.

Chang, R., Nam, J., and Sun, W. (2008). Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue Eng Part A* *14*, 41-48.

Chang, T.S., Kim, M.J., Ryoo, K., Park, J., Eom, S.J., Shim, J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Tomita, M., Takahashi, K., *et al.* (2003). p57KIP2 modulates stress-activated signaling by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein Kinase. *J Biol Chem* *278*, 48092-48098.

Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* *276*, 1425-1428.

Chen, F., Kook, H., Milewski, R., Gitler, A.D., Lu, M.M., Li, J., Nazarian, R., Schnepf, R., Jen, K., Biben, C., *et al.* (2002). Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development. *Cell* *110*, 713-723.

Chen, L., An, H.Z., and Doyle, P.S. (2015). Synthesis of Nonspherical Microcapsules through Controlled Polyelectrolyte Coating of Hydrogel Templates. *Langmuir* *31*, 9228-9235.

Chen, L., Toke, N.H., Luo, S., Vasoya, R.P., Fullem, R.L., Parthasarathy, A., Perekatt, A.O., and Verzi, M.P. (2019). A reinforcing HNF4-SMAD4 feed-forward module stabilizes enterocyte identity. *Nat Genet.*

Cheng, H., and Bjerknes, M. (1985). Whole population cell kinetics and postnatal development of the mouse intestinal epithelium. *Anat Rec* *211*, 420-426.

Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* *141*, 461-479.

Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* *141*, 537-561.

Cheung, A.F., Carter, A.M., Kostova, K.K., Woodruff, J.F., Crowley, D., Bronson, R.T., Haigis, K.M., and Jacks, T. (2010). Complete deletion of Apc results in severe polyposis in mice. *Oncogene* *29*, 1857-1864.

Chin, A.M., Hill, D.R., Aurora, M., and Spence, J.R. (2017). Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Semin Cell Dev Biol* *66*, 81-93.

Chung, B.G., Flanagan, L.A., Rhee, S.W., Schwartz, P.H., Lee, A.P., Monuki, E.S., and Jeon, N.L. (2005). Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. *Lab Chip* *5*, 401-406.

- Ciemerych, M.A., and Sicinski, P. (2005). Cell cycle in mouse development. *Oncogene* *24*, 2877-2898.
- Clevers, H. (2013a). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* *154*, 274-284.
- Clevers, H. (2013b). Stem Cells: A unifying theory for the crypt. *Nature* *495*, 53-54.
- Costello, C.M., Hongpeng, J., Shaffiey, S., Yu, J., Jain, N.K., Hackam, D., and March, J.C. (2014a). Synthetic small intestinal scaffolds for improved studies of intestinal differentiation. *Biotechnol Bioeng* *111*, 1222-1232.
- Costello, C.M., Sorna, R.M., Goh, Y.L., Cengic, I., Jain, N.K., and March, J.C. (2014b). 3-D intestinal scaffolds for evaluating the therapeutic potential of probiotics. *Mol Pharm* *11*, 2030-2039.
- Cotsarelis, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* *61*, 1329-1337.
- Cruz-Acuna, R., Quiros, M., Farkas, A.E., Dedhia, P.H., Huang, S., Siuda, D., Garcia-Hernandez, V., Miller, A.J., Spence, J.R., Nusrat, A., *et al.* (2017). Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair. *Nat Cell Biol* *19*, 1326-1335.
- Cruz-Acuna, R., Quiros, M., Huang, S., Siuda, D., Spence, J.R., Nusrat, A., and Garcia, A.J. (2018). PEG-4MAL hydrogels for human organoid generation, culture, and in vivo delivery. *Nat Protoc* *13*, 2102-2119.
- Cui, H., Nowicki, M., Fisher, J.P., and Zhang, L.G. (2017). 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Adv Healthc Mater* *6*.
- Cui, X., and Boland, T. (2009). Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* *30*, 6221-6227.
- Cui, X., Breitenkamp, K., Finn, M.G., Lotz, M., and D'Lima, D.D. (2012). Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng Part A* *18*, 1304-1312.
- de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.K., Li, V.S., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., *et al.* (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* *476*, 293-297.
- de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev* *28*, 305-316.
- De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* *10*, 9.
- Degirmenci, B., Valenta, T., Dimitrieva, S., Hausmann, G., and Basler, K. (2018). GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells. *Nature* *558*, 449-453.
- Dekaney, C.M., Gulati, A.S., Garrison, A.P., Helmraath, M.A., and Henning, S.J. (2009). Regeneration of intestinal stem/progenitor cells following doxorubicin treatment of mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *297*, G461-470.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* *82*, 675-684.
- Deutsch, J., Motlagh, D., Russell, B., and Desai, T.A. (2000). Fabrication of microtextured membranes for cardiac myocyte attachment and orientation. *J Biomed Mater Res* *53*, 267-275.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* *17*, 1253-1270.
- Dovey, J.S., Zacharek, S.J., Kim, C.F., and Lees, J.A. (2008). Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 11857-11862.

Drury, J.L., and Mooney, D.J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337-4351.

Drzewiecki, K.E., Malavade, J.N., Ahmed, I., Lowe, C.J., and Shreiber, D.I. (2017). A thermoreversible, photocrosslinkable collagen bio-ink for free-form fabrication of scaffolds for regenerative medicine. *Technology (Singap World Sci)* 5, 185-195.

Dugas, J.C., Ibrahim, A., and Barres, B.A. (2007). A crucial role for p57(Kip2) in the intracellular timer that controls oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 27, 6185-6196.

Duquesnes, N., Callot, C., Jeannot, P., Daburon, V., Nakayama, K.I., Manenti, S., Davy, A., and Besson, A. (2016). p57(Kip2) knock-in mouse reveals CDK-independent contribution in the development of Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pathol* 239, 250-261.

Durand, A., Donahue, B., Peignon, G., Letourneur, F., Cagnard, N., Slomianny, C., Perret, C., Shroyer, N.F., and Romagnolo, B. (2012). Functional intestinal stem cells after Paneth cell ablation induced by the loss of transcription factor Math1 (Atoh1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8965-8970.

Dutton, J.S., Hinman, S.S., Kim, R., Wang, Y., and Allbritton, N.L. (2019). Primary Cell-Derived Intestinal Models: Recapitulating Physiology. *Trends Biotechnol* 37, 744-760.

Edington, C.D., Chen, W.L.K., Geishecker, E., Kassis, T., Soenksen, L.R., Bhushan, B.M., Freake, D., Kirschner, J., Maass, C., Tsamandouras, N., *et al.* (2018). Interconnected Microphysiological Systems for Quantitative Biology and Pharmacology Studies. *Sci Rep* 8, 4530.

Eggermann, T., Algar, E., Lapunzina, P., Mackay, D., Maher, E.R., Mannens, M., Netchine, I., Prawitt, D., Riccio, A., Temple, I.K., *et al.* (2014a). Clinical utility gene card for: Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Eur J Hum Genet* 22.

Eggermann, T., Binder, G., Brioude, F., Maher, E.R., Lapunzina, P., Cubellis, M.V., Bergada, I., Prawitt, D., and Begemann, M. (2014b). CDKN1C mutations: two sides of the same coin. *Trends Mol Med* 20, 614-622.

Ehrmann, R.L., and Gey, G.O. (1956). The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst* 16, 1375-1403.

Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., and Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51-56.

Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3, 519-532.

El-Sherbiny, I.M., and Yacoub, M.H. (2013). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract* 2013, 316-342.

Elliott, M., Bayly, R., Cole, T., Temple, I.K., and Maher, E.R. (1994). Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet* 46, 168-174.

Emerman, J.T., and Pitelka, D.R. (1977). Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro* 13, 316-328.

Escobar, M., Nicolas, P., Sangar, F., Laurent-Chabalier, S., Clair, P., Joubert, D., Jay, P., and Legraverend, C. (2011). Intestinal epithelial stem cells do not protect their genome by asymmetric chromosome segregation. *Nat Commun* 2, 258.

Farin, H.F., Jordens, I., Mosa, M.H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D.V., de Punder, K., Angers, S., Peters, P.J., Maurice, M.M., *et al.* (2016). Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* 530, 340-343.

Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 143, 1518-1529 e1517.

- Fatehullah, A., Tan, S.H., and Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol* 18, 246-254.
- Fearnhead, N.S., Britton, M.P., and Bodmer, W.F. (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10, 721-733.
- Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M., and Kemp, C.J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177-180.
- Figliola, R., Busanello, A., Vaccarello, G., and Maione, R. (2008). Regulation of p57(KIP2) during muscle differentiation: role of Egr1, Sp1 and DNA hypomethylation. *J Mol Biol* 380, 265-277.
- Fitzpatrick, G.V., Soloway, P.D., and Higgins, M.J. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet* 32, 426-431.
- Flanagan, D.J., Pheasant, T.J., Barker, N., Schwab, R.H., Amin, N., Malaterre, J., Stange, D.E., Nowell, C.J., Currie, S.A., Saw, J.T., *et al.* (2015). Frizzled7 functions as a Wnt receptor in intestinal epithelial Lgr5(+) stem cells. *Stem Cell Reports* 4, 759-767.
- Formeister, E.J., Sionas, A.L., Lorange, D.K., Barkley, C.L., Lee, G.H., and Magness, S.T. (2009). Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G1108-1118.
- Fre, S., Hannezo, E., Sale, S., Huyghe, M., Lafkas, D., Kissel, H., Louvi, A., Greve, J., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2011). Notch lineages and activity in intestinal stem cells determined by a new set of knock-in mice. *PLoS One* 6, e25785.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435, 964-968.
- Friedrich, J., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol* 83, 849-871.
- Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I., and Gotoh, Y. (2013). p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J* 32, 970-981.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., *et al.* (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 43, 34-41.
- Gagne, D., Groulx, J.F., Benoit, Y.D., Basora, N., Herring, E., Vachon, P.H., and Beaulieu, J.F. (2010). Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 222, 387-400.
- Gao, B., Yang, Q., Zhao, X., Jin, G., Ma, Y., and Xu, F. (2016). 4D Bioprinting for Biomedical Applications. *Trends Biotechnol* 34, 746-756.
- Gauvin, R., Chen, Y.C., Lee, J.W., Soman, P., Zorlutuna, P., Nichol, J.W., Bae, H., Chen, S., and Khademhosseini, A. (2012). Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials* 33, 3824-3834.
- Georgia, S., Soliz, R., Li, M., Zhang, P., and Bhushan, A. (2006). p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors. *Dev Biol* 298, 22-31.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci* 69, 2907-2917.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., *et al.* (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226-230.
- Gerbe, F., van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.F., Pignodel, C., *et al.* (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 192, 767-780.

Gildner, C.D., Lerner, A.L., and Hocking, D.C. (2004). Fibronectin matrix polymerization increases tensile strength of model tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *287*, H46-53.

Giovannini, C., Gramantieri, L., Minguzzi, M., Fornari, F., Chieco, P., Grazi, G.L., and Bolondi, L. (2012). CDKN1C/P57 is regulated by the Notch target gene Hes1 and induces senescence in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* *181*, 413-422.

Gjorevski, N., and Lutolf, M.P. (2017). Synthesis and characterization of well-defined hydrogel matrices and their application to intestinal stem cell and organoid culture. *Nat Protoc* *12*, 2263-2274.

Gjorevski, N., Sachs, N., Manfrin, A., Giger, S., Bragina, M.E., Ordonez-Moran, P., Clevers, H., and Lutolf, M.P. (2016). Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature* *539*, 560-564.

Gobin, A.S., and West, J.L. (2003). Effects of epidermal growth factor on fibroblast migration through biomimetic hydrogels. *Biotechnol Prog* *19*, 1781-1785.

Gonzalez, S., Perez-Perez, M.M., Hernando, E., Serrano, M., and Cordon-Cardo, C. (2005). p73beta-Mediated apoptosis requires p57kip2 induction and IEX-1 inhibition. *Cancer Res* *65*, 2186-2192.

Gottle, P., Sabo, J.K., Heinen, A., Venables, G., Torres, K., Tzekova, N., Parras, C.M., Kremer, D., Hartung, H.P., Cate, H.S., *et al.* (2015). Oligodendroglial maturation is dependent on intracellular protein shuttling. *J Neurosci* *35*, 906-919.

Grandjean, V., Smith, J., Schofield, P.N., and Ferguson-Smith, A.C. (2000). Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5279-5284.

Greenberg, R.A., Allsopp, R.C., Chin, L., Morin, G.B., and DePinho, R.A. (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* *16*, 1723-1730.

Gregorieff, A., Liu, Y., Inanlou, M.R., Khomchuk, Y., and Wrana, J.L. (2015). Yap-dependent reprogramming of Lgr5(+) stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature* *526*, 715-718.

Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destree, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* *129*, 626-638.

Gregorieff, A., Stange, D.E., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009). The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* *137*, 1333-1345 e1331-1333.

Griep, L.M., Wolbers, F., de Wagenaar, B., ter Braak, P.M., Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.O., Vermes, I., van der Meer, A.D., and van den Berg, A. (2013). BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomed Microdevices* *15*, 145-150.

Gross, B.C., Erkal, J.L., Lockwood, S.Y., Chen, C., and Spence, D.M. (2014). Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal Chem* *86*, 3240-3253.

Grosse, A.S., Pressprich, M.F., Curley, L.B., Hamilton, K.L., Margolis, B., Hildebrand, J.D., and Gumucio, D.L. (2011). Cell dynamics in fetal intestinal epithelium: implications for intestinal growth and morphogenesis. *Development* *138*, 4423-4432.

Groulx, J.F., Gagne, D., Benoit, Y.D., Martel, D., Basora, N., and Beaulieu, J.F. (2011). Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions. *Matrix Biol* *30*, 195-206.

Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G., and Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* *8*, 2939-2952.

Guarnieri, D., De Capua, A., Ventre, M., Borzacchiello, A., Pedone, C., Marasco, D., Ruvo, M., and Netti, P.A. (2010). Covalently immobilized RGD gradient on PEG hydrogel scaffold influences cell migration parameters. *Acta Biomater* *6*, 2532-2539.

Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J., and Joyner, A.L. (1994). Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* *371*, 333-336.

Guiu, J., Hannezo, E., Yui, S., Demharter, S., Ulyanchenko, S., Maimets, M., Jorgensen, A., Perlman, S., Lundvall, L., Mamsen, L.S., *et al.* (2019). Tracing the origin of adult intestinal stem cells. *Nature*.

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

Hall, H.G., Farson, D.A., and Bissell, M.J. (1982). Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 4672-4676.

Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* *371*, 257-261.

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

Haramis, A.P., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* *303*, 1684-1686.

Hardwick, J.C., Van Den Brink, G.R., Bleuming, S.A., Ballester, I., Van Den Brande, J.M., Keller, J.J., Offerhaus, G.J., Van Deventer, S.J., and Peppelenbosch, M.P. (2004). Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* *126*, 111-121.

Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., and Tilghman, S.M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* *405*, 486-489.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* *75*, 805-816.

Harrison, R.G., Greenman, M., Mall, F.P., and Jackson, C. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record* *1*, 116-128.

Hashimoto, Y., Kohri, K., Kaneko, Y., Morisaki, H., Kato, T., Ikeda, K., and Nakanishi, M. (1998). Critical role for the 310 helix region of p57(Kip2) in cyclin-dependent kinase 2 inhibition and growth suppression. *J Biol Chem* *273*, 16544-16550.

Hattori, N., Davies, T.C., Anson-Cartwright, L., and Cross, J.C. (2000). Periodic expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) in trophoblast giant cells defines a G2-like gap phase of the endocycle. *Mol Biol Cell* *11*, 1037-1045.

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

Heinen, A., Kremer, D., Gottle, P., Kruse, F., Hasse, B., Lehmann, H., Hartung, H.P., and Kury, P. (2008a). The cyclin-dependent kinase inhibitor p57kip2 is a negative regulator of Schwann cell differentiation and in vitro myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8748-8753.

Heinen, A., Kremer, D., Hartung, H.P., and Kury, P. (2008b). p57 kip2's role beyond Schwann cell cycle control. *Cell Cycle* *7*, 2781-2786.

Hern, D.L., and Hubbell, J.A. (1998). Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J Biomed Mater Res* *39*, 266-276.

Heuberger, J., Kosel, F., Qi, J., Grossmann, K.S., Rajewsky, K., and Birchmeier, W. (2014). Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 3472-3477.

Hidalgo, I.J., Raub, T.J., and Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* *96*, 736-749.

Hiemstra, C., Aa, L.J., Zhong, Z., Dijkstra, P.J., and Feijen, J. (2007). Rapidly in situ-forming degradable hydrogels from dextran thiols through Michael addition. *Biomacromolecules* 8, 1548-1556.

Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15, 2672-2681.

Hirata, M., Kugimiya, F., Fukai, A., Ohba, S., Kawamura, N., Ogasawara, T., Kawasaki, Y., Saito, T., Yano, F., Ikeda, T., *et al.* (2009). C/EBPbeta Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PLoS One* 4, e4543.

Holmberg, J., Genander, M., Halford, M.M., Anneren, C., Sondell, M., Chumley, M.J., Silvany, R.E., Henkemeyer, M., and Frisen, J. (2006). EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 125, 1151-1163.

Hong, A.W., Meng, Z., and Guan, K.L. (2016). The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 324-337.

Hua, G., Thin, T.H., Feldman, R., Haimovitz-Friedman, A., Clevers, H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2012). Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology* 143, 1266-1276.

Huh, D., Hamilton, G.A., and Ingber, D.E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* 21, 745-754.

Huh, D., Matthews, B.D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H.Y., and Ingber, D.E. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328, 1662-1668.

Imajo, M., Ebisuya, M., and Nishida, E. (2015). Dual role of YAP and TAZ in renewal of the intestinal epithelium. *Nat Cell Biol* 17, 7-19.

Ishibashi, F., Shimizu, H., Nakata, T., Fujii, S., Suzuki, K., Kawamoto, A., Anzai, S., Kuno, R., Nagata, S., Ito, G., *et al.* (2018). Contribution of ATOH1(+) Cells to the Homeostasis, Repair, and Tumorigenesis of the Colonic Epithelium. *Stem Cell Reports* 10, 27-42.

Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Gotoh, Y. (2007). The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J Biol Chem* 282, 390-396.

Itzkowitz, S., Lyubimova, A., Blat, I.C., Maynard, M., van Es, J., Lees, J., Jacks, T., Clevers, H., and van Oudenaarden, A. (2011). Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. *Nat Cell Biol* 14, 106-114.

Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397, 164-168.

Jadasz, J.J., Rivera, F.J., Taubert, A., Kandasamy, M., Sandner, B., Weidner, N., Aktas, O., Hartung, H.P., Aigner, L., and Kury, P. (2012). p57kip2 regulates glial fate decision in adult neural stem cells. *Development* 139, 3306-3315.

Jadhav, U., Nalapareddy, K., Saxena, M., O'Neill, N.K., Pinello, L., Yuan, G.C., Orkin, S.H., and Shivdasani, R.A. (2016). Acquired Tissue-Specific Promoter Bivalency Is a Basis for PRC2 Necessity in Adult Cells. *Cell* 165, 1389-1400.

Jadhav, U., Saxena, M., O'Neill, N.K., Saadatpour, A., Yuan, G.C., Herbert, Z., Murata, K., and Shivdasani, R.A. (2017). Dynamic Reorganization of Chromatin Accessibility Signatures during Dedifferentiation of Secretory Precursors into Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Stem Cell* 21, 65-77 e65.

Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., and Garcia, K.C. (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59-64.

Jang, K.J., Mehr, A.P., Hamilton, G.A., McPartlin, L.A., Chung, S., Suh, K.Y., and Ingber, D.E. (2013). Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol (Camb)* 5, 1119-1129.

Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Kedinger, M., and Gradwohl, G. (2002). Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J* 21, 6338-6347.

Jia, J., Lin, M., Zhang, L., York, J.P., and Zhang, P. (2007). The Notch signaling pathway controls the size of the ocular lens by directly suppressing p57Kip2 expression. *Mol Cell Biol* 27, 7236-7247.

Joaquin, M., Gubern, A., Gonzalez-Nunez, D., Josue Ruiz, E., Ferreiro, I., de Nadal, E., Nebreda, A.R., and Posas, F. (2012). The p57 CDKi integrates stress signals into cell-cycle progression to promote cell survival upon stress. *EMBO J* 31, 2952-2964.

Joaquin, M., and Watson, R.J. (2003). The cell cycle-regulated B-Myb transcription factor overcomes cyclin-dependent kinase inhibitory activity of p57(KIP2) by interacting with its cyclin-binding domain. *J Biol Chem* 278, 44255-44264.

Johnson, L.A., Rodansky, E.S., Sauder, K.L., Horowitz, J.C., Mih, J.D., Tschumperlin, D.J., and Higgins, P.D. (2013). Matrix stiffness corresponding to strictured bowel induces a fibrogenic response in human colonic fibroblasts. *Inflamm Bowel Dis* 19, 891-903.

Jones, J.C., Brindley, C.D., Elder, N.H., Myers, M.G., Jr., Rajala, M.W., Dekaney, C.M., McNamee, E.N., Frey, M.R., Shroyer, N.F., and Dempsey, P.J. (2018). Cellular Plasticity of Defa4(Cre)-Expressing Paneth Cells in Response to Notch Activation and Intestinal Injury. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 7, 533-554.

Jones, R.G., Li, X., Gray, P.D., Kuang, J., Clayton, F., Samowitz, W.S., Madison, B.B., Gumucio, D.L., and Kuwada, S.K. (2006). Conditional deletion of beta1 integrins in the intestinal epithelium causes a loss of Hedgehog expression, intestinal hyperplasia, and early postnatal lethality. *J Cell Biol* 175, 505-514.

Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W., and Burgess, A.W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53.

Joseph, B., Andersson, E.R., Vlachos, P., Sodersten, E., Liu, L., Teixeira, A.I., and Hermanson, O. (2009). p57Kip2 is a repressor of Mash1 activity and neuronal differentiation in neural stem cells. *Cell Death Differ* 16, 1256-1265.

Joseph, B., Wallen-Mackenzie, A., Benoit, G., Murata, T., Joodmardi, E., Okret, S., and Perlmann, T. (2003). p57(Kip2) cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15619-15624.

Jubb, A.M., Chalasani, S., Frantz, G.D., Smits, R., Grabsch, H.I., Kavi, V., Maughan, N.J., Hillan, K.J., Quirke, P., and Koepfen, H. (2006). Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. *Oncogene* 25, 3445-3457.

Juskova, P., Ollitrault, A., Serra, M., Viovy, J.L., and Malaquin, L. (2018). Resolution improvement of 3D stereo-lithography through the direct laser trajectory programming: Application to microfluidic deterministic lateral displacement device. *Anal Chim Acta* 1000, 239-247.

Kaaij, L.T., van de Wetering, M., Fang, F., Decato, B., Molaro, A., van de Werken, H.J., van Es, J.H., Schuijers, J., de Wit, E., de Laat, W., *et al.* (2013). DNA methylation dynamics during intestinal stem cell differentiation reveals enhancers driving gene expression in the villus. *Genome Biol* 14, R50.

Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, Aliyev, J., Wu, Y., Bunte, R., *et al.* (2014). Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development* 141, 2206-2215.

Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10231-10236.

Kanaya, T., Hase, K., Takahashi, D., Fukuda, S., Hoshino, K., Sasaki, I., Hemmi, H., Knoop, K.A., Kumar, N., Sato, M., *et al.* (2012). The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol* *13*, 729-736.

Kao, H.Y., Downes, M., Ordentlich, P., and Evans, R.M. (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev* *14*, 55-66.

Karlsson, L., Lindahl, P., Heath, J.K., and Betsholtz, C. (2000). Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development* *127*, 3457-3466.

Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., Scholl, W., Zhang, C., Rickner, H., Richmond, C.A., *et al.* (2018). Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep* *8*, 2871.

Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., and Kaestner, K.H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* *129*, 2619-2628.

Kavanagh, E., and Joseph, B. (2011). The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochim Biophys Acta* *1816*, 50-56.

Kavanagh, E., Vlachos, P., Emourgeon, V., Rodhe, J., and Joseph, B. (2012). p57(KIP2) control of actin cytoskeleton dynamics is responsible for its mitochondrial pro-apoptotic effect. *Cell Death Dis* *3*, e311.

Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, S., Fukui, H., Seno, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., *et al.* (2003). Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* *535*, 131-135.

Keriquel, V., Oliveira, H., Remy, M., Ziane, S., Delmond, S., Rousseau, B., Rey, S., Catros, S., Amedee, J., Guillemot, F., *et al.* (2017). In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Sci Rep* *7*, 1778.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol (Oxf)* *204*, 17-33.

Kikuchi, T., Toyota, M., Itoh, F., Suzuki, H., Obata, T., Yamamoto, H., Kakiuchi, H., Kusano, M., Issa, J.P., Tokino, T., *et al.* (2002). Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene* *21*, 2741-2749.

Kim, H.J., Huh, D., Hamilton, G., and Ingber, D.E. (2012a). Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip* *12*, 2165-2174.

Kim, H.J., and Ingber, D.E. (2013). Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr Biol (Camb)* *5*, 1130-1140.

Kim, H.J., Li, H., Collins, J.J., and Ingber, D.E. (2016). Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, E7-15.

Kim, M., Nakamoto, T., Nishimori, S., Tanaka, K., and Chiba, T. (2008). A new ubiquitin ligase involved in p57KIP2 proteolysis regulates osteoblast cell differentiation. *EMBO Rep* *9*, 878-884.

Kim, S.H., Chi, M., Yi, B., Kim, S.H., Oh, S., Kim, Y., Park, S., and Sung, J.H. (2014a). Three-dimensional intestinal villi epithelium enhances protection of human intestinal cells from bacterial infection by inducing mucin expression. *Integr Biol (Camb)* *6*, 1122-1131.

Kim, T.H., Escudero, S., and Shivdasani, R.A. (2012b). Intact function of Lgr5 receptor-expressing intestinal stem cells in the absence of Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 3932-3937.

Kim, T.H., Li, F., Ferreiro-Neira, I., Ho, L.L., Luyten, A., Nalapareddy, K., Long, H., Verzi, M., and Shivdasani, R.A. (2014b). Broadly permissive intestinal chromatin underlies lateral inhibition and cell plasticity. *Nature* *506*, 511-515.

Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* *12*, 319-330.

Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K., and Nakayama, K. (1999). An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J* *18*, 2401-2410.

Kleinman, H.K., and Martin, G.R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* *15*, 378-386.

Knoop, K.A., Kumar, N., Butler, B.R., Sakthivel, S.K., Taylor, R.T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., and Williams, I.R. (2009). RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* *183*, 5738-5747.

Koch, L., Deiwick, A., Schlie, S., Michael, S., Gruene, M., Coger, V., Zychlinski, D., Schambach, A., Reimers, K., Vogt, P.M., *et al.* (2012). Skin tissue generation by laser cell printing. *Biotechnol Bioeng* *109*, 1855-1863.

Kokkinis, G., Keplinger, F., and Giouroudi, I. (2013). On-chip microfluidic biosensor using superparamagnetic microparticles. *Biomicrofluidics* *7*, 54117.

Kolachala, V.L., Bajaj, R., Wang, L., Yan, Y., Ritzenthaler, J.D., Gewirtz, A.T., Roman, J., Merlin, D., and Sitaraman, S.V. (2007). Epithelial-derived fibronectin expression, signaling, and function in intestinal inflammation. *J Biol Chem* *282*, 32965-32973.

Kolesky, D.B., Truby, R.L., Gladman, A.S., Busbee, T.A., Homan, K.A., and Lewis, J.A. (2014). 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater* *26*, 3124-3130.

Koo, B.K., Lim, H.S., Chang, H.J., Yoon, M.J., Choi, Y., Kong, M.P., Kim, C.H., Kim, J.M., Park, J.G., and Kong, Y.Y. (2009). Notch signaling promotes the generation of EphrinB1-positive intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* *137*, 145-155, 155 e141-143.

Koo, B.K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., van de Wetering, M., van Es, J.H., Mohammed, S., Heck, A.J., Maurice, M.M., *et al.* (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* *488*, 665-669.

Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* *19*, 379-383.

Kosinski, C., Li, V.S., Chan, A.S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., *et al.* (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 15418-15423.

Kremer, D., Heinen, A., Jadasz, J., Gottle, P., Zimmermann, K., Zickler, P., Jander, S., Hartung, H.P., and Kury, P. (2009). p57kip2 is dynamically regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis and interferes with oligodendroglial maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 9087-9092.

Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., and Kuo, C.J. (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*, 266-271.

LaBarbera, D.V., Reid, B.G., and Yoo, B.H. (2012). The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* *7*, 819-830.

Laederich, M.B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K.L., 3rd, and Sweeney, C. (2004). The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* *279*, 47050-47056.

Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* *345*, 1247125.

- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurler, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* *501*, 373-379.
- Lang, S., von Philipsborn, A.C., Bernard, A., Bonhoeffer, F., and Bastmeyer, M. (2008). Growth cone response to ephrin gradients produced by microfluidic networks. *Anal Bioanal Chem* *390*, 809-816.
- Langer, R. (2000). Tissue engineering. *Mol Ther* *1*, 12-15.
- Langlands, A.J., Almet, A.A., Appleton, P.L., Newton, I.P., Osborne, J.M., and Nathke, I.S. (2016). Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. *PLoS Biol* *14*, e1002491.
- Lee, C.R., Grodzinsky, A.J., and Spector, M. (2001). The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials* *22*, 3145-3154.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* *9*, 639-649.
- Lee, W., Lee, T.G., and Koh, W.-G. (2007). Grafting of Poly (acrylic acid) on the Poly (ethylene glycol) Hydrogel Using Surface-initiated Photopolymerization for Covalent Immobilization of Collagen. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* *13*, 1195-1200.
- Leighton, P.A., Saam, J.R., Ingram, R.S., Stewart, C.L., and Tilghman, S.M. (1995). An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev* *9*, 2079-2089.
- Leishman, E., Howard, J.M., Garcia, G.E., Miao, Q., Ku, A.T., Dekker, J.D., Tucker, H., and Nguyen, H. (2013). Foxp1 maintains hair follicle stem cell quiescence through regulation of Fgf18. *Development* *140*, 3809-3818.
- Leung, C., Tan, S.H., and Barker, N. (2018). Recent Advances in Lgr5(+) Stem Cell Research. *Trends Cell Biol* *28*, 380-391.
- Li, J., Chen, M., Fan, X., and Zhou, H. (2016a). Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. *J Transl Med* *14*, 271.
- Li Jeon, N., Baskaran, H., Dertinger, S.K., Whitesides, G.M., Van de Water, L., and Toner, M. (2002). Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat Biotechnol* *20*, 826-830.
- Li, J.Q., Wu, F., Usuki, H., Kubo, A., Masaki, T., Fujita, J., Bando, S., Saoo, K., Takeuchi, H., Kuriyama, S., *et al.* (2003). Loss of p57KIP2 is associated with colorectal carcinogenesis. *Int J Oncol* *23*, 1537-1543.
- Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* *327*, 542-545.
- Li, N., Nakauka-Ddamba, A., Tobias, J., Jensen, S.T., and Lengner, C.J. (2016b). Mouse Label-Retaining Cells Are Molecularly and Functionally Distinct From Reserve Intestinal Stem Cells. *Gastroenterology* *151*, 298-310 e297.
- Li, N., Yousefi, M., Nakauka-Ddamba, A., Jain, R., Tobias, J., Epstein, J.A., Jensen, S.T., and Lengner, C.J. (2014). Single-cell analysis of proxy reporter allele-marked epithelial cells establishes intestinal stem cell hierarchy. *Stem Cell Reports* *3*, 876-891.
- Li, V.S., Ng, S.S., Boersema, P.J., Low, T.Y., Karthaus, W.R., Gerlach, J.P., Mohammed, S., Heck, A.J., Maurice, M.M., Mahmoudi, T., *et al.* (2012). Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* *149*, 1245-1256.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* *140*, 3079-3093.
- Lind, J.U., Busbee, T.A., Valentine, A.D., Pasqualini, F.S., Yuan, H., Yadid, M., Park, S.J., Kotikian, A., Nesmith, A.P., Campbell, P.H., *et al.* (2017). Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nat Mater* *16*, 303-308.

- Lindemans, C.A., Calafiore, M., Mertelsmann, A.M., O'Connor, M.H., Dudakov, J.A., Jenq, R.R., Velardi, E., Young, L.F., Smith, O.M., Lawrence, G., *et al.* (2015). Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* 528, 560-564.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-847.
- Liu, W., Li, H., Hong, S.H., Piszczek, G.P., Chen, W., and Rodgers, G.P. (2016). Olfactomedin 4 deletion induces colon adenocarcinoma in *Apc*(Min/+) mice. *Oncogene* 35, 5237-5247.
- Lo, Y.H., Chung, E., Li, Z., Wan, Y.W., Mahe, M.M., Chen, M.S., Noah, T.K., Bell, K.N., Yalamanchili, H.K., Klisch, T.J., *et al.* (2017). Transcriptional Regulation by ATOH1 and its Target SPDEF in the Intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3, 51-71.
- Lopez-Garcia, C., Klein, A.M., Simons, B.D., and Winton, D.J. (2010). Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science* 330, 822-825.
- Luo, J.H., Ding, Y., Chen, R., Michalopoulos, G., Nelson, J., Tseng, G., and Yu, Y.P. (2013). Genome-wide methylation analysis of prostate tissues reveals global methylation patterns of prostate cancer. *Am J Pathol* 182, 2028-2036.
- Lutolf, M.P., and Hubbell, J.A. (2003). Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition. *Biomacromolecules* 4, 713-722.
- Lutolf, M.P., Raeber, G.P., Zisch, A.H., Tirelli, N., and Hubbell, J.A. (2003). Cell-responsive synthetic hydrogels. *Advanced materials* 15, 888-892.
- Ma, Y., Chen, L., Wright, G.M., Pillai, S.R., Chellappan, S.P., and Cress, W.D. (2010). CDKN1C negatively regulates RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation in an E2F1-dependent manner. *J Biol Chem* 285, 9813-9822.
- Ma, Y., and Cress, W.D. (2007). Transcriptional upregulation of p57 (Kip2) by the cyclin-dependent kinase inhibitor BMS-387032 is E2F dependent and serves as a negative feedback loop limiting cytotoxicity. *Oncogene* 26, 3532-3540.
- Mabbott, N.A., Donaldson, D.S., Ohno, H., Williams, I.R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6, 666-677.
- Mademtzoglou, D., Alonso-Martin, S., Chang, T.H., Bismuth, K., Drayton-Libotte, B., Aurade, F., and Relaix, F. (2017). A p57 conditional mutant allele that allows tracking of p57-expressing cells. *Genesis* 55.
- Mademtzoglou, D., Asakura, Y., Borok, M.J., Alonso-Martin, S., Mourikis, P., Kodaka, Y., Mohan, A., Asakura, A., and Relaix, F. (2018). Cellular localization of the cell cycle inhibitor *Cdkn1c* controls growth arrest of adult skeletal muscle stem cells. *Elife* 7.
- Mahoney, Z.X., Stappenbeck, T.S., and Miner, J.H. (2008). Laminin alpha 5 influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J Cell Sci* 121, 2493-2502.
- Mairet-Coello, G., Tury, A., Van Buskirk, E., Robinson, K., Genestine, M., and DiCicco-Bloom, E. (2012). p57(KIP2) regulates radial glia and intermediate precursor cell cycle dynamics and lower layer neurogenesis in developing cerebral cortex. *Development* 139, 475-487.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., and Kim, D.H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv* 34, 422-434.
- Mannoor, M.S., Jiang, Z., James, T., Kong, Y.L., Malatesta, K.A., Soboyejo, W.O., Verma, N., Gracias, D.H., and McAlpine, M.C. (2013). 3D printed bionic ears. *Nano Lett* 13, 2634-2639.

- Mao, J., Kim, B.M., Rajurkar, M., Shivdasani, R.A., and McMahon, A.P. (2010). Hedgehog signaling controls mesenchymal growth in the developing mammalian digestive tract. *Development* *137*, 1721-1729.
- Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P., and Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* *61*, 6234-6238.
- Matsumoto, A., Hashimoto, K., Yoshioka, T., and Otani, H. (2002). Occlusion and subsequent re-canalization in early duodenal development of human embryos: integrated organogenesis and histogenesis through a possible epithelial-mesenchymal interaction. *Anat Embryol (Berl)* *205*, 53-65.
- Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *9*, 262-271.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* *9*, 650-662.
- Melchels, F.P., Feijen, J., and Grijpma, D.W. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* *31*, 6121-6130.
- Meran, L., Baulies, A., and Li, V.S.W. (2017). Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem Cells Int* *2017*, 7970385.
- Merlos-Suarez, A., and Batlle, E. (2008). Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 194-200.
- Metcalfe, C., Kljavin, N.M., Ybarra, R., and de Sauvage, F.J. (2014). Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell* *14*, 149-159.
- Michael, S., Sorg, H., Peck, C.T., Koch, L., Deiwick, A., Chichkov, B., Vogt, P.M., and Reimers, K. (2013). Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber in mice. *PLoS One* *8*, e57741.
- Michalopoulos, G., and Pitot, H.C. (1975). Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res* *94*, 70-78.
- Mironi-Harpaz, I., Wang, D.Y., Venkatraman, S., and Seliktar, D. (2012). Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater* *8*, 1838-1848.
- Mohammad, F., Mondal, T., Guseva, N., Pandey, G.K., and Kanduri, C. (2010). Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development* *137*, 2493-2499.
- Molofsky, A.V., He, S., Bydon, M., Morrison, S.J., and Pardal, R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* *19*, 1432-1437.
- Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* *425*, 962-967.
- Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E., Henderson, D.E., Baffour-Awuah, N.Y., Ambruzs, D.M., Fogli, L.K., Algra, S., *et al.* (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 179-184.
- Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J.H., Hamilton, S.R., Adams, H.P., Zhang, J., Clevers, H., and de Crombrugge, B. (2007). SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* *133*, 539-546.
- Moriyama, M., Durham, A.D., Moriyama, H., Hasegawa, K., Nishikawa, S., Radtke, F., and Osawa, M. (2008). Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell* *14*, 594-604.

Moroni, L., Boland, T., Burdick, J.A., De Maria, C., Derby, B., Forgacs, G., Groll, J., Li, Q., Malda, J., Mironov, V.A., *et al.* (2018). Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol* 36, 384-402.

Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.

Munoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., *et al.* (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J* 31, 3079-3091.

Murphy, S.V., and Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 32, 773-785.

Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nagata, M., Tomita, K., and Nakayama, K. (2001). Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development. *Anat Embryol (Berl)* 203, 77-87.

Nakao, Y., Kimura, H., Sakai, Y., and Fujii, T. (2011). Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device. *Biomicrofluidics* 5, 22212.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., and Nakayama, K. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-720.

Nakayama, K., and Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* 20, 1020-1029.

Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11, 2323-2334.

Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., *et al.* (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G231-241.

Nguyen, K.T., and West, J.L. (2002). Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 23, 4307-4314.

Nichol, J.W., Koshy, S.T., Bae, H., Hwang, C.M., Yamanlar, S., and Khademhosseini, A. (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 31, 5536-5544.

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 767-779.

Nigmatullina, L., Norkin, M., Dzama, M.M., Messner, B., Sayols, S., and Soshnikova, N. (2017). Id2 controls specification of Lgr5(+) intestinal stem cell progenitors during gut development. *EMBO J* 36, 869-885.

Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985-999.

Nusse, R., and Varmus, H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.

Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

Orkin, R.W., Gehron, P., McGoodwin, E.B., Martin, G.R., Valentine, T., and Swarm, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 145, 204-220.

Otsuki, L., and Brand, A.H. (2018). Cell cycle heterogeneity directs the timing of neural stem cell activation from quiescence. *Science* 360, 99-102.

Otsuki, L., and Brand, A.H. (2019). Dorsal-Ventral Differences in Neural Stem Cell Quiescence Are Induced by p57(KIP2)/Dacapo. *Dev Cell* 49, 293-300 e293.

- Ouellette, A.J. (2010). Paneth cells and innate mucosal immunity. *Curr Opin Gastroenterol* 26, 547-553.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 839-845.
- Pandey, R.R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T., Mancini-Dinardo, D., and Kanduri, C. (2008). *Kcnq1ot1* antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell* 32, 232-246.
- Park, E.T., Oh, H.K., Gum, J.R., Jr., Crawley, S.C., Kakar, S., Engel, J., Leow, C.C., Gao, W.Q., and Kim, Y.S. (2006). HATH1 expression in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Clin Cancer Res* 12, 5403-5410.
- Park, H.C., Boyce, J., Shin, J., and Appel, B. (2005). Oligodendrocyte specification in zebrafish requires notch-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor function. *J Neurosci* 25, 6836-6844.
- Park, I.K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 302-305.
- Park, J., Lee, B.K., Jeong, G.S., Hyun, J.K., Lee, C.J., and Lee, S.H. (2015). Three-dimensional brain-on-a-chip with an interstitial level of flow and its application as an in vitro model of Alzheimer's disease. *Lab Chip* 15, 141-150.
- Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-1027.
- Pateras, I.S., Apostolopoulou, K., Koutsami, M., Evangelou, K., Tsantoulis, P., Liloglou, T., Nikolaidis, G., Sigala, F., Kittas, C., Field, J.K., *et al.* (2006). Downregulation of the KIP family members p27(KIP1) and p57(KIP2) by SKP2 and the role of methylation in p57(KIP2) inactivation in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 119, 2546-2556.
- Pateras, I.S., Apostolopoulou, K., Niforou, K., Kotsinas, A., and Gorgoulis, V.G. (2009). "Kip"ing the cell under control. *Mol Cancer Res* 7, 1902-1919.
- Pati, F., Gantelius, J., and Svahn, H.A. (2016). 3D Bioprinting of Tissue/Organ Models. *Angew Chem Int Ed Engl* 55, 4650-4665.
- Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K.H., Kopan, R., Lewis, J., and Radtke, F. (2011). Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology* 140, 1230-1240 e1231-1237.
- Peppas, N., Bures, P., Leobandung, W., and Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 50, 27-46.
- Peppas, N.A., Hilt, J.Z., Khademhosseini, A., and Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Advanced materials* 18, 1345-1360.
- Pereira, R.F., and Bártolo, P.J. (2015). 3D photo-fabrication for tissue engineering and drug delivery. *Engineering* 1, 090-112.
- Petersen, O.W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A.R., and Bissell, M.J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9064-9068.
- Petry, A.C., and de la Motte, C.A. (2017). The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* 33, 234-238.
- Petrova, T.V., Nykanen, A., Normen, C., Ivanov, K.I., Andersson, L.C., Haglund, C., Puolakkainen, P., Wempe, F., von Melchner, H., Gradwohl, G., *et al.* (2008). Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell* 13, 407-419.

Phelps, E.A., Landazuri, N., Thule, P.M., Taylor, W.R., and Garcia, A.J. (2010). Bioartificial matrices for therapeutic vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 3323-3328.

Pippa, R., Espinosa, L., Gundem, G., Garcia-Escudero, R., Dominguez, A., Orlando, S., Gallastegui, E., Saiz, C., Besson, A., Pujol, M.J., *et al.* (2012). p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene* *31*, 4207-4220.

Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., and Lippincott-Schwartz, J. (2007). *Cell Biology E-Book* (Elsevier Health Sciences).

Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., and Massague, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* *78*, 59-66.

Potten, C.S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* *269*, 518-521.

Potten, C.S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *353*, 821-830.

Potten, C.S., Hume, W.J., Reid, P., and Cairns, J. (1978). The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell* *15*, 899-906.

Potten, C.S., Owen, G., and Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* *115*, 2381-2388.

Pounds, S., and Dyer, M.A. (2008). Statistical analysis of data from retroviral clonal experiments in the developing retina. *Brain Res* *1192*, 178-185.

Pourchet, L.J., Thepot, A., Albouy, M., Courtial, E.J., Boher, A., Blum, L.J., and Marquette, C.A. (2017). Human Skin 3D Bioprinting Using Scaffold-Free Approach. *Adv Healthc Mater* *6*.

Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Washington, M.K., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S.E., *et al.* (2012). The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* *149*, 146-158.

Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., *et al.* (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5(+) stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat Commun* *8*, 13824.

Qiu, Z., Li, Y., Zeng, B., Guan, X., and Li, H. (2018). Downregulated CDKN1C/p57(kip2) drives tumorigenesis and associates with poor overall survival in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* *497*, 187-193.

Quyn, A.J., Appleton, P.L., Carey, F.A., Steele, R.J., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R.A., Sansom, O.J., and Nathke, I.S. (2010). Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell* *6*, 175-181.

Ramanan, V., Scull, M.A., Sheahan, T.P., Rice, C.M., and Bhatia, S.N. (2014). *New Methods in Tissue Engineering: Improved Models for Viral Infection*. *Annu Rev Virol* *1*, 475-499.

Reik, W., and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* *2*, 21-32.

Reynaud, E.G., Guillier, M., Leibovitch, M.P., and Leibovitch, S.A. (2000a). Dimerization of the amino terminal domain of p57Kip2 inhibits cyclin D1-cdk4 kinase activity. *Oncogene* *19*, 1147-1152.

Reynaud, E.G., Leibovitch, M.P., Tintignac, L.A., Pospel, K., Guillier, M., and Leibovitch, S.A. (2000b). Stabilization of MyoD by direct binding to p57(Kip2). *J Biol Chem* *275*, 18767-18776.

Reynaud, E.G., Pospel, K., Guillier, M., Leibovitch, M.P., and Leibovitch, S.A. (1999). p57(Kip2) stabilizes the MyoD protein by inhibiting cyclin E-Cdk2 kinase activity in growing myoblasts. *Mol Cell Biol* *19*, 7621-7629.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* *175*, 1-13.

Rheinwald, J.G., and Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343.

Riccio, O., van Gijn, M.E., Bezdek, A.C., Pellegrinet, L., van Es, J.H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Honjo, T., Clevers, H., and Radtke, F. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep* 9, 377-383.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50, 649-657.

Ritsma, L., Ellenbroek, S.I.J., Zomer, A., Snippert, H.J., de Sauvage, F.J., Simons, B.D., Clevers, H., and van Rheenen, J. (2014). Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. *Nature* 507, 362-365.

Rizk, P., and Barker, N. (2012). Gut stem cells in tissue renewal and disease: methods, markers, and myths. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 4, 475-496.

Rodriguez, S., Wang, L., Mumaw, C., Srour, E.F., Lo Celso, C., Nakayama, K., and Carlesso, N. (2011). The SKP2 E3 ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of HSCs. *Blood* 117, 6509-6519.

Roeb, W., Boyer, A., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (2007). PAX3-FOXO1 controls expression of the p57Kip2 cell-cycle regulator through degradation of EGR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18085-18090.

Romanelli, V., Belinchon, A., Benito-Sanz, S., Martinez-Glez, V., Gracia-Bouthelie, R., Heath, K.E., Campos-Barros, A., Garcia-Minaur, S., Fernandez, L., Meneses, H., *et al.* (2010). CDKN1C (p57(Kip2)) analysis in Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) patients: Genotype-phenotype correlations, novel mutations, and polymorphisms. *Am J Med Genet A* 152A, 1390-1397.

Rossi, G., Manfrin, A., and Lutolf, M.P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* 19, 671-687.

Rothschild, G., Zhao, X., Iavarone, A., and Lasorella, A. (2006). E Proteins and Id2 converge on p57Kip2 to regulate cell cycle in neural cells. *Mol Cell Biol* 26, 4351-4361.

Ruedinger, F., Lavrentieva, A., Blume, C., Pepelanova, I., and Scheper, T. (2015). Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 623-636.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.

Sabnis, A., Rahimi, M., Chapman, C., and Nguyen, K.T. (2009). Cytocompatibility studies of an in situ photopolymerized thermoresponsive hydrogel nanoparticle system using human aortic smooth muscle cells. *J Biomed Mater Res A* 91, 52-59.

Saha, S., Aranda, E., Hayakawa, Y., Bhanja, P., Atay, S., Brodin, N.P., Li, J., Asfaha, S., Liu, L., Taylor, Y., *et al.* (2016). Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat Commun* 7, 13096.

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., *et al.* (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 11, 76-83.

Samuelsson, M.K., Pazirandeh, A., Davani, B., and Okret, S. (1999). p57Kip2, a glucocorticoid-induced inhibitor of cell cycle progression in HeLa cells. *Mol Endocrinol* 13, 1811-1822.

Samuelsson, M.K., Pazirandeh, A., and Okret, S. (2002). A pro-apoptotic effect of the CDK inhibitor p57(Kip2) on staurosporine-induced apoptosis in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 702-709.

Sancho, R., Cremona, C.A., and Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO Rep* 16, 571-581.

Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* 40, 915-920.

Santos, A.J.M., Lo, Y.H., Mah, A.T., and Kuo, C.J. (2018). The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations. *Trends Cell Biol* 28, 1062-1078.

Sasaki, N., Sachs, N., Wiebrands, K., Ellenbroek, S.I., Fumagalli, A., Lyubimova, A., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J.H., Karthaus, W.R., *et al.* (2016). Reg4⁺ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5⁺ stem cells in colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E5399-5407.

Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340, 1190-1194.

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

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.

Satoh, Y., Nakadate, H., Nakagawachi, T., Higashimoto, K., Joh, K., Masaki, Z., Uozumi, J., Kaneko, Y., Mukai, T., and Soejima, H. (2006). Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer* 95, 541-547.

Saunders, R.E., Gough, J.E., and Derby, B. (2008). Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. *Biomaterials* 29, 193-203.

Scandura, J.M., Boccuni, P., Massague, J., and Nimer, S.D. (2004). Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15231-15236.

Schepers, A.G., Vries, R., van den Born, M., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *EMBO J* 30, 1104-1109.

Schmitt, M., Schewe, M., Sacchetti, A., Feijtel, D., van de Geer, W.S., Teeuwssen, M., Sleddens, H.F., Joosten, R., van Royen, M.E., van de Werken, H.J.G., *et al.* (2018). Paneth Cells Respond to Inflammation and Contribute to Tissue Regeneration by Acquiring Stem-like Features through SCF/c-Kit Signaling. *Cell Rep* 24, 2312-2328 e2317.

Schuijers, J., Junker, J.P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B.K., Sasselli, V., van der Flier, L.G., Cuppen, E., van Oudenaarden, A., and Clevers, H. (2015). Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell* 16, 158-170.

Schuller-Ravoo, S., Teixeira, S.M., Feijen, J., Grijpma, D.W., and Poot, A.A. (2013). Flexible and elastic scaffolds for cartilage tissue engineering prepared by stereolithography using poly(trimethylene carbonate)-based resins. *Macromol Biosci* 13, 1711-1719.

Schwarze, S.R., Shi, Y., Fu, V.X., Watson, P.A., and Jarrard, D.F. (2001). Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 20, 8184-8192.

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.

Shamir, E.R., and Ewald, A.J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 647-664.

Sheaffer, K.L., Kim, R., Aoki, R., Elliott, E.N., Schug, J., Burger, L., Schubeler, D., and Kaestner, K.H. (2014). DNA methylation is required for the control of stem cell differentiation in the small intestine. *Genes Dev* 28, 652-664.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

Shin, W., Hinojosa, C.D., Ingber, D.E., and Kim, H.J. (2019). Human Intestinal Morphogenesis Controlled by Transepithelial Morphogen Gradient and Flow-Dependent Physical Cues in a Microengineered Gut-on-a-Chip. *iScience* 15, 391-406.

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

Shroyer, N.F., Wallis, D., Venken, K.J., Bellen, H.J., and Zoghbi, H.Y. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19, 2412-2417.

Simian, M., and Bissell, M.J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol* 216, 31-40.

Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., and Bissell, M.J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128, 3117-3131.

Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G.P., Stephanopoulos, G.N., Wang, D.I., Whitesides, G.M., and Ingber, D.E. (1994). Engineering cell shape and function. *Science* 264, 696-698.

Skardal, A., Mack, D., Kapetanovic, E., Atala, A., Jackson, J.D., Yoo, J., and Soker, S. (2012). Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem Cells Transl Med* 1, 792-802.

Smith, R.J., Rao-Bhatia, A., and Kim, T.H. (2017). Signaling and epigenetic mechanisms of intestinal stem cells and progenitors: insight into crypt homeostasis, plasticity, and niches. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 6.

Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es, J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., *et al.* (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143, 134-144.

Snippert, H.J., van Es, J.H., van den Born, M., Begthel, H., Stange, D.E., Barker, N., and Clevers, H. (2009). Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. *Gastroenterology* 136, 2187-2194 e2181.

Srinivasan, T., Than, E.B., Bu, P., Tung, K.L., Chen, K.Y., Augenlicht, L., Lipkin, S.M., and Shen, X. (2016). Notch signalling regulates asymmetric division and inter-conversion between lgr5 and bmi1 expressing intestinal stem cells. *Sci Rep* 6, 26069.

Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a007898.

Stampone, E., Caldarelli, I., Zullo, A., Bencivenga, D., Mancini, F.P., Della Ragione, F., and Borriello, A. (2018). Genetic and Epigenetic Control of CDKN1C Expression: Importance in Cell Commitment and Differentiation, Tissue Homeostasis and Human Diseases. *Int J Mol Sci* 19.

Steinkamp, M., Geerling, I., Seufferlein, T., von Boyen, G., Egger, B., Grossmann, J., Ludwig, L., Adler, G., and Reinshagen, M. (2003). Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 1748-1757.

Stewart, M.C., Kadlcek, R.M., Robbins, P.D., MacLeod, J.N., and Ballock, R.T. (2004). Expression and activity of the CDK inhibitor p57Kip2 in chondrocytes undergoing hypertrophic differentiation. *J Bone Miner Res* 19, 123-132.

Storm, E.E., Durinck, S., de Sousa e Melo, F., Tremayne, J., Kljavin, N., Tan, C., Ye, X., Chiu, C., Pham, T., Hongo, J.A., *et al.* (2016). Targeting PTPRK-RSPO3 colon tumours promotes differentiation and loss of stem-cell function. *Nature* 529, 97-100.

Streuli, C.H., Bailey, N., and Bissell, M.J. (1991). Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* *115*, 1383-1395.

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

Suh, H.N., Kim, M.J., Jung, Y.S., Lien, E.M., Jun, S., and Park, J.I. (2017). Quiescence Exit of Tert(+) Stem Cells by Wnt/beta-Catenin Is Indispensable for Intestinal Regeneration. *Cell Rep* *21*, 2571-2584.

Sumigray, K.D., Terwilliger, M., and Lechler, T. (2018). Morphogenesis and Compartmentalization of the Intestinal Crypt. *Dev Cell* *45*, 183-197 e185.

Sung, J.H., Yu, J., Luo, D., Shuler, M.L., and March, J.C. (2011). Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model. *Lab Chip* *11*, 389-392.

Suryadinata, R., Sadowski, M., and Sarcevic, B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep* *30*, 243-255.

Susaki, E., Nakayama, K., Yamasaki, L., and Nakayama, K.I. (2009). Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 5192-5197.

Sutherland, R.M., McCredie, J.A., and Inch, W.R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* *46*, 113-120.

Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* *11*, 791-801.

Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M.R., Wang, Q., Lu, M.M., and Epstein, J.A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science* *334*, 1420-1424.

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., and He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* *407*, 530-535.

Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., and He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* *13*, 149-156.

Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T., Hara, E., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2012). Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* *427*, 285-292.

Teixeira, A.I., Abrams, G.A., Bertics, P.J., Murphy, C.J., and Nealey, P.F. (2003). Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci* *116*, 1881-1892.

Teller, I.C., and Beaulieu, J.F. (2001). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* *3*, 1-18.

Tetteh, P.W., Basak, O., Farin, H.F., Wiebrands, K., Kretschmar, K., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., de Sauvage, F., van Es, J.H., *et al.* (2016). Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Cell Stem Cell* *18*, 203-213.

Tetteh, P.W., Farin, H.F., and Clevers, H. (2015). Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia. *Trends Cell Biol* *25*, 100-108.

Thomas, J.T., Canelos, P., Luyten, F.P., and Moos, M., Jr. (2009). Xenopus SMOC-1 Inhibits bone morphogenetic protein signaling downstream of receptor binding and is essential for postgastrulation development in Xenopus. *J Biol Chem* *284*, 18994-19005.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145-1147.

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

- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., and Martin, G.R. (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254, 9933-9937.
- Tokino, T., Urano, T., Furuhashi, T., Matsushima, M., Miyatsu, T., Sasaki, S., and Nakamura, Y. (1996). Characterization of the human p57KIP2 gene: alternative splicing, insertion/deletion polymorphisms in VNTR sequences in the coding region, and mutational analysis. *Hum Genet* 97, 625-631.
- Tomic, G., Morrissey, E., Kozar, S., Ben-Moshe, S., Hoyle, A., Azzarelli, R., Kemp, R., Chilamakuri, C.S.R., Itzkovitz, S., Philpott, A., *et al.* (2018). Phospho-regulation of ATOH1 Is Required for Plasticity of Secretory Progenitors and Tissue Regeneration. *Cell Stem Cell* 23, 436-443 e437.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Tsugu, A., Sakai, K., Dirks, P.B., Jung, S., Weksberg, R., Fei, Y.L., Mondal, S., Ivanchuk, S., Ackerley, C., Hamel, P.A., *et al.* (2000). Expression of p57(KIP2) potently blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol* 157, 919-932.
- Ullah, Z., Kohn, M.J., Yagi, R., Vassilev, L.T., and DePamphilis, M.L. (2008). Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes Dev* 22, 3024-3036.
- Urano, T., Yashiroda, H., Muraoka, M., Tanaka, K., Hosoi, T., Inoue, S., Ouchi, Y., and Toyoshima, H. (1999). p57(Kip2) is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor beta1. *J Biol Chem* 274, 12197-12200.
- Urrios, A., Parra-Cabrera, C., Bhattacharjee, N., Gonzalez-Suarez, A.M., Rigat-Brugarolas, L.G., Nallapatti, U., Samitier, J., DeForest, C.A., Posas, F., Garcia-Cordero, J.L., *et al.* (2016). 3D-printing of transparent bio-microfluidic devices in PEG-DA. *Lab Chip* 16, 2287-2294.
- Vaccarello, G., Figliola, R., Cramerotti, S., Novelli, F., and Maione, R. (2006). p57Kip2 is induced by MyoD through a p73-dependent pathway. *J Mol Biol* 356, 578-588.
- Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A.E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M.B., Hausmann, G., Cantu, C., Aguet, M., and Basler, K. (2016). Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell Rep* 15, 911-918.
- Valk-Lingbeek, M.E., Bruggeman, S.W., and van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118, 409-418.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.
- van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 71, 241-260.
- van der Flier, L.G., Haegebarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009a). OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 137, 15-17.
- Van der Flier, L.G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M.E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G., *et al.* (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* 132, 628-632.
- van der Flier, L.G., van Gijn, M.E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., *et al.* (2009b). Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* 136, 903-912.
- van Es, J.H., de Geest, N., van de Born, M., Clevers, H., and Hassan, B.A. (2010). Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. *Nat Commun* 1, 18.
- van Es, J.H., Haegebarth, A., Kujala, P., Itzkovitz, S., Koo, B.K., Boj, S.F., Korving, J., van den Born, M., van Oudenaarden, A., Robine, S., *et al.* (2012a). A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol Cell Biol* 32, 1918-1927.

van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., *et al.* (2005). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* 7, 381-386.

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

van Kooten, T.G., Whitesides, J.F., and von Recum, A. (1998). Influence of silicone (PDMS) surface texture on human skin fibroblast proliferation as determined by cell cycle analysis. *J Biomed Mater Res* 43, 1-14.

Van Landeghem, L., Santoro, M.A., Krebs, A.E., Mah, A.T., Dehmer, J.J., Gracz, A.D., Scull, B.P., McNaughton, K., Magness, S.T., and Lund, P.K. (2012). Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G1111-1132.

van Velthoven, C.T.J., and Rando, T.A. (2019). Stem Cell Quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling. *Cell Stem Cell* 24, 213-225.

VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, A., *et al.* (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 139, 488-497.

VanDussen, K.L., and Samuelson, L.C. (2010). Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Dev Biol* 346, 215-223.

Varelas, X., Miller, B.W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F.A., Sakuma, R., Pawson, T., Hunziker, W., McNeill, H., *et al.* (2010). The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell* 18, 579-591.

Verhulsel, M., Vignes, M., Descroix, S., Malaquin, L., Vignjevic, D.M., and Viovy, J.L. (2014). A review of microfabrication and hydrogel engineering for micro-organs on chips. *Biomaterials* 35, 1816-1832.

Vidrich, A., Buzan, J.M., Brodrick, B., Ilo, C., Bradley, L., Fendig, K.S., Sturgill, T., and Cohn, S.M. (2009). Fibroblast growth factor receptor-3 regulates Paneth cell lineage allocation and accrual of epithelial stem cells during murine intestinal development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297, G168-178.

Vlachos, P., and Joseph, B. (2009). The Cdk inhibitor p57(Kip2) controls LIM-kinase 1 activity and regulates actin cytoskeleton dynamics. *Oncogene* 28, 4175-4188.

Vlachos, P., Nyman, U., Hajji, N., and Joseph, B. (2007). The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cell Death Differ* 14, 1497-1507.

Volk, N., and Lacy, B. (2017). Anatomy and Physiology of the Small Bowel. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 27, 1-13.

von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 529, 221-225.

Vozzi, G., Flaim, C., Ahluwalia, A., and Bhatia, S. (2003). Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. *Biomaterials* 24, 2533-2540.

Wakeling, E.L., Brioude, F., Lokulo-Sodipe, O., O'Connell, S.M., Salem, J., Bliet, J., Canton, A.P., Chrzanowska, K.H., Davies, J.H., Dias, R.P., *et al.* (2017). Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol* 13, 105-124.

Walton, K.D., Freddo, A.M., Wang, S., and Gumucio, D.L. (2016a). Generation of intestinal surface: an absorbing tale. *Development* 143, 2261-2272.

Walton, K.D., Kolterud, A., Czerwinski, M.J., Bell, M.J., Prakash, A., Kushwaha, J., Grosse, A.S., Schnell, S., and Gumucio, D.L. (2012). Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15817-15822.

- Walton, K.D., Whidden, M., Kolterud, A., Shoffner, S.K., Czerwinski, M.J., Kushwaha, J., Parmar, N., Chandhrasekhar, D., Freddo, A.M., Schnell, S., *et al.* (2016b). Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. *Development* *143*, 427-436.
- Wang, F., Weaver, V.M., Petersen, O.W., Larabell, C.A., Dedhar, S., Briand, P., Lupu, R., and Bissell, M.J. (1998). Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14821-14826.
- Wang, L., Murthy, S.K., Fowle, W.H., Barabino, G.A., and Carrier, R.L. (2009). Influence of micro-well biomimetic topography on intestinal epithelial Caco-2 cell phenotype. *Biomaterials* *30*, 6825-6834.
- Wang, R.N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., *et al.* (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* *1*, 87-105.
- Wang, Y., DiSalvo, M., Gunasekara, D.B., Dutton, J., Proctor, A., Lebharr, M.S., Williamson, I.A., Speer, J., Howard, R.L., Smiddy, N.M., *et al.* (2017a). Self-renewing Monolayer of Primary Colonic or Rectal Epithelial Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* *4*, 165-182 e167.
- Wang, Y., Gunasekara, D.B., Reed, M.I., DiSalvo, M., Bultman, S.J., Sims, C.E., Magness, S.T., and Allbritton, N.L. (2017b). A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials* *128*, 44-55.
- Watanabe, H., Pan, Z.Q., Schreiber-Agus, N., DePinho, R.A., Hurwitz, J., and Xiong, Y. (1998). Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 1392-1397.
- Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damsky, C., and Bissell, M.J. (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* *137*, 231-245.
- Wee, P., and Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* *9*.
- Weibel, D.B., Diluzio, W.R., and Whitesides, G.M. (2007). Microfabrication meets microbiology. *Nat Rev Microbiol* *5*, 209-218.
- Weis, B., Schmidt, J., Maamar, H., Raj, A., Lin, H., Toth, C., Riedmann, K., Raddatz, G., Seitz, H.K., Ho, A.D., *et al.* (2015). Inhibition of intestinal tumor formation by deletion of the DNA methyltransferase 3a. *Oncogene* *34*, 1822-1830.
- Weiswald, L.B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* *17*, 1-15.
- Weksberg, R., Shuman, C., and Beckwith, J.B. (2010). Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* *18*, 8-14.
- Westbury, J., Watkins, M., Ferguson-Smith, A.C., and Smith, J. (2001). Dynamic temporal and spatial regulation of the cdk inhibitor p57(kip2) during embryo morphogenesis. *Mech Dev* *109*, 83-89.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* *442*, 368-373.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* *423*, 448-452.
- Wilson, H. (1907). On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *Journal of Experimental Zoology* *5*, 245-258.
- Wong, V.W., Stange, D.E., Page, M.E., Buczacki, S., Wabik, A., Itami, S., van de Wetering, M., Poulsom, R., Wright, N.A., Trotter, M.W., *et al.* (2012). Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat Cell Biol* *14*, 401-408.

Yamada, A., Vignes, M., Bureau, C., Mamane, A., Venzac, B., Descroix, S., Viovy, J.L., Villard, C., Peyrin, J.M., and Malaquin, L. (2016). In-mold patterning and actionable axo-somatic compartmentalization for on-chip neuron culture. *Lab Chip* *16*, 2059-2068.

Yamada, M., Udagawa, J., Matsumoto, A., Hashimoto, R., Hatta, T., Nishita, M., Minami, Y., and Otani, H. (2010). Ror2 is required for midgut elongation during mouse development. *Dev Dyn* *239*, 941-953.

Yamamizu, K., Matsunaga, T., Uosaki, H., Fukushima, H., Katayama, S., Hiraoka-Kanie, M., Mitani, K., and Yamashita, J.K. (2010). Convergence of Notch and beta-catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. *J Cell Biol* *189*, 325-338.

Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S., Eto, K., Ema, H., and Nakauchi, H. (2009). TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* *113*, 1250-1256.

Yan, K.S., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva, M.R., *et al.* (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 466-471.

Yan, K.S., Gevaert, O., Zheng, G.X.Y., Anchang, B., Probert, C.S., Larkin, K.A., Davies, P.S., Cheng, Z.F., Kaddis, J.S., Han, A., *et al.* (2017). Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell Stem Cell* *21*, 78-90 e76.

Yan, Y., Frisen, J., Lee, M.H., Massague, J., and Barbacid, M. (1997). Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev* *11*, 973-983.

Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* *294*, 2155-2158.

Yang, W., Yu, H., Liang, W., Wang, Y., and Liu, L. (2015). Rapid fabrication of hydrogel microstructures using UV-induced projection printing. *Micromachines* *6*, 1903-1913.

Yang, X., Karuturi, R.K., Sun, F., Aau, M., Yu, K., Shao, R., Miller, L.D., Tan, P.B., and Yu, Q. (2009). CDKN1C (p57) is a direct target of EZH2 and suppressed by multiple epigenetic mechanisms in breast cancer cells. *PLoS One* *4*, e5011.

Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., and Camargo, F.D. (2014). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* *157*, 1324-1338.

Yin, X., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M., and Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* *18*, 25-38.

Yokoo, T., Toyoshima, H., Miura, M., Wang, Y., Iida, K.T., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Gotoda, T., Nishimori, S., *et al.* (2003). p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J Biol Chem* *278*, 52919-52923.

Yu, J., Peng, S., Luo, D., and March, J.C. (2012). In vitro 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination. *Biotechnol Bioeng* *109*, 2173-2178.

Yu, S., Tong, K., Zhao, Y., Balasubramanian, I., Yap, G.S., Ferraris, R.P., Bonder, E.M., Verzi, M.P., and Gao, N. (2018). Paneth Cell Multipotency Induced by Notch Activation following Injury. *Cell Stem Cell* *23*, 46-59 e45.

Yuan, H., Xing, K., and Hsu, H.Y. (2018). Trinity of Three-Dimensional (3D) Scaffold, Vibration, and 3D Printing on Cell Culture Application: A Systematic Review and Indicating Future Direction. *Bioengineering (Basel)* *5*.

Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M.M., Tamayol, A., Annabi, N., and Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* *73*, 254-271.

Yui, S., Azzolin, L., Maimets, M., Pedersen, M.T., Fordham, R.P., Hansen, S.L., Larsen, H.L., Guiu, J., Alves, M.R.P., Rundsten, C.F., *et al.* (2018). YAP/TAZ-Dependent Reprogramming of Colonic Epithelium Links ECM Remodeling to Tissue Regeneration. *Cell Stem Cell* 22, 35-49 e37.

Zacharek, S.J., Fillmore, C.M., Lau, A.N., Gludish, D.W., Chou, A., Ho, J.W., Zamponi, R., Gazit, R., Bock, C., Jager, N., *et al.* (2011). Lung stem cell self-renewal relies on BMI1-dependent control of expression at imprinted loci. *Cell Stem Cell* 9, 272-281.

Zalc, A., Hayashi, S., Aurade, F., Brohl, D., Chang, T., Mademtzoglou, D., Mourikis, P., Yao, Z., Cao, Y., Birchmeier, C., *et al.* (2014). Antagonistic regulation of p57kip2 by Hes/Hey downstream of Notch signaling and muscle regulatory factors regulates skeletal muscle growth arrest. *Development* 141, 2780-2790.

Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., *et al.* (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367-375.

Zhang, B., Korolj, A., Lai, B.F.L., and Radisic, M. (2018). Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials*, 1.

Zhang, J., Liu, W.L., Tang, D.C., Chen, L., Wang, M., Pack, S.D., Zhuang, Z., and Rodgers, G.P. (2002). Identification and characterization of a novel member of olfactomedin-related protein family, hGC-1, expressed during myeloid lineage development. *Gene* 283, 83-93.

Zhang, N., Yantiss, R.K., Nam, H.S., Chin, Y., Zhou, X.K., Scherl, E.J., Bosworth, B.P., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A.J., and Benezra, R. (2014). ID1 is a functional marker for intestinal stem and progenitor cells required for normal response to injury. *Stem Cell Reports* 3, 716-724.

Zhang, P., Liegeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A., and Elledge, S.J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151-158.

Zhang, P., Wong, C., DePinho, R.A., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1998). Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev* 12, 3162-3167.

Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (1999). p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev* 13, 213-224.

Zhao, Y., Li, Y., Mao, S., Sun, W., and Yao, R. (2015). The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication* 7, 045002.

Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., Dawson, D., Willis, J.E., Markowitz, S.D., Camargo, F.D., *et al.* (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E1312-1320.

Zhu, J. (2010). Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 31, 4639-4656.

Zhu, J., Beamish, J.A., Tang, C., Kottke-Marchant, K., and Marchant, R.E. (2006). Extracellular matrix-like cell-adhesive hydrogels from RGD-containing poly (ethylene glycol) diacrylate. *Macromolecules* 39, 1305-1307.

Zhu, J., Hu, J., and Marchant, R. (2013). Biomimetic hydrogels as scaffolds for tissue-engineering applications. In *Biomimetic Biomaterials* (Elsevier), pp. 238-275.

Zhu, J., and Marchant, R.E. (2011). Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 8, 607-626.

Zhu, J., Tang, C., Kottke-Marchant, K., and Marchant, R.E. (2009a). Design and synthesis of biomimetic hydrogel scaffolds with controlled organization of cyclic RGD peptides. *Bioconjug Chem* 20, 333-339.

Zhu, L., Gibson, P., Currle, D.S., Tong, Y., Richardson, R.J., Bayazitov, I.T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D.W., and Gilbertson, R.J. (2009b). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457, 603-607.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9, 247-261.