



HAL
open science

Étude du signal véhiculé par les hormones thyroïdiennes dans la physiopathologie intestinale

Luis Joël Uchuya Castillo

► **To cite this version:**

Luis Joël Uchuya Castillo. Étude du signal véhiculé par les hormones thyroïdiennes dans la physiopathologie intestinale. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1221 . tel-01743821

HAL Id: tel-01743821

<https://theses.hal.science/tel-01743821>

Submitted on 26 Mar 2018

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.



N°d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie Cellulaire
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue publiquement le 27/10/2017, par :
Luis Joël Uchuya Castillo

Etude du signal véhiculé par les hormones thyroïdiennes dans la physiopathologie intestinale

Devant le jury composé de :

Lamartine, Jérôme, Professeur des Universités, Université Lyon1/IBCP, Président

Cavaillès, Vincent, Directeur de Recherche/CNRS, IRC de Montpellier, Rapporteur
Duluc, Isabelle, Chargée de recherche/Inserm, Université de Strasbourg, Rapporteur
Billaud Marc, Directeur de Recherche/CNRS, CRCL, Examineur
Sachs Laurent, Directeur de Recherche/CNRS, MNHN, Examineur

Plateroti, Michelina, Directeur de recherche/Inserm, CRCL, Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Sommaire

Sommaire	4
Remerciements	6
Abréviations	8
Figures et tableaux	11
INTRODUCTION	13
Première partie : L'épithélium intestinal, un tissu en constant renouvellement	14
I. Structure de l'intestin chez les mammifères	15
A) L'intestin grêle	15
1) Les cryptes de Lieberkühn	15
2) La villosité.....	16
B) Le colon	17
II. Voies de signalisation impliquées dans le contrôle et régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal	18
A) Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie intestinale.....	19
1) La voie de signalisation Wnt/ β -caténine	19
2) La voie de signalisation Notch	23
3) La voie de signalisation BMP : Bone Morphogenic Protein.....	24
4) La voie de signalisation SHH : Sonic Hedgehog.....	26
B) Contrôle et régulation du maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal.....	28
1) Rôle des voies de signalisation Wnt et Notch.....	28
2) Rôle des voies de signalisations BMP et SHH.....	29
C) La signature «souche» de l'épithélium intestinal.....	31
D) Signaux contribuant à la destinée cellulaire.....	33
Deuxième partie: la voie des hormones thyroïdiennes et rôle dans la physiopathologie intestinale	37
I. La voie des hormones thyroïdiennes	38
A) Les hormones thyroïdiennes.....	38
1) Synthèse et régulation hormonale	38
2) Transport des hormones thyroïdiennes.....	39
3) Métabolisme des hormones thyroïdiennes.....	40
B) Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes.....	42
1) Structures et isoformes.....	42
2) Mécanismes d'actions.....	44
C) Actions non génomiques de la voie des hormones thyroïdiennes	45
II. Rôle des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans la physiopathologie	48
A) TR β	48
B) TR α	49
III. Rôle de la voie des hormones thyroïdiennes dans le développement de l'intestin	51
A) Rôles des hormones thyroïdiennes	51
B) Rôles des récepteurs aux hormones thyroïdiennes	51
IV. Coopération entre TRα1 et voies de signalisation	53

A) Coopération entre TR α 1 et la voie Wnt	53
B) Coopération entre TR α 1 et la voie Notch	54
Troisième partie : cancer colorectal, initiation et progression	57
I. Cancers colorectaux	58
A) Description	58
1) Facteurs de risque et dépistage.....	58
2) Classification tumorale	59
B) Traitements contre le cancer colorectal	59
II. Initiation et progression tumorale.....	61
A) Adenomatous polyposis (APC) : la protéine suppresseur de tumeur.....	61
B) Mécanismes impliqués dans la progression tumorale	63
C) Origine des cancers colorectaux.....	67
1) Les cellules souches.....	67
2) Les cellules souches cancéreuses	67
3) Les cellules différenciées.....	68
D) L'hétérogénéité tumorale	69
III. Caractérisation moléculaire du cancer colorectal.....	71
A) Classification de sous-types de cancer de colon (CCS) (De Sousa E Melo et al., 2013)	71
B) Classification CRCA (Colorectal cancer asigner) (Sadanandam et al., 2013).....	72
C) Sous-types moléculaires de cancer de colon (CCMS) (Marisa et al., 2013)	73
D) Classification CRCSC (Colorectal cancer subtyping consortium) (Guinney et al., 2015)	74
IV. Implication de la voie Wnt dans la progression tumorale	77
Quatrième partie : la voie des hormones thyroïdiennes et cancer	79
I. Hormones thyroïdiennes et cancer	80
A) Un effet pro-tumoral des hormones thyroïdiennes.....	80
B) Un effet anti-tumoral des hormones thyroïdiennes	81
II. Récepteurs aux hormones thyroïdiennes et cancer	81
A) TR β 1 et son implication dans la carcinogenèse	81
B) TR α 1 et son implication dans la carcinogenèse	82
Objectif des travaux de thèse	84
Modèles utilisés	86
I. Modèles murins.....	86
II. Modèle humain.....	87
RESULTATS	89
Article I.....	90
Article II.....	93
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	95
I. Analyse moléculaire de l'impact de TRα1 dans la tumorigenèse intestinale.....	96
A) TR α 1, un régulateur de la voie Wnt/ β -caténine	96
B) Wif1, une cible de TR α 1	97
C) Une voie Wnt fortement régulée.....	98
D) D'autres mécanismes à analyser.....	99
II. TRα1 et implication dans le cancer colorectal	100
A) Confirmation des données murines chez l'homme.....	100
B) TR α 1, un marqueur d'une hétérogénéité tumorale.....	101
BIBLIOGRAPHIE	103

Remerciements

Je remercie tout d'abord Vincent Cavaillès et Isabelle Duluc qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse malgré un emploi du temps chargé. Je remercie également Marc Billaud, Laurent Sachs et Jérôme Lamartine qui ont accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier Michela Plateroti, ma directrice de thèse. Elle m'a accueilli dans son équipe pendant 5 ans depuis mon premier stage de M2. Elle m'a accordé sa confiance et a su m'encadrer pendant ces années. Ses conseils ont été précieux pour le bon déroulement de ma thèse et je lui en suis très reconnaissant.

Merci au professeur Jérôme Honnorat de m'avoir accueilli dans son équipe pendant mon stage de M1. Merci à Nicole Thomasset et Aubin de m'avoir encadré et de m'avoir fait découvrir la recherche académique. C'est grâce à eux que j'ai décidé de continuer dans la recherche.

Je remercie également chaque membre de l'équipe. :

- Matthias, collègue thésard de l'équipe, mais qui a été le camarade parfait dans et hors du laboratoire. Nous avons partagé de très bons moments et il m'a beaucoup aidé à garder la motivation pendant les dernières années. Merci pour ses conseils, sa bonne humeur, sa disponibilité et son amitié
- Merci à Carla, post-doc qui a eu le courage de partager un bureau avec trois garçons. Je n'oublierai jamais sa bonne humeur et les cours de français que nous lui avons donnés avec les membres de l'équipe.
- Merci également à Nicolas pour sa bonne humeur et son soutien. A peine arrivé dans l'équipe, il a su me donner conseil et il a été d'une aide précieuse pour la finalisation de l'article.
- Merci à Stéphane pour ses conseils, pour sa bonne humeur et sa disponibilité pour toute aide demandée.
- Merci aux différents stagiaires qui sont passés par l'équipe Elodie, Angelina, Anthony, Dounia, Slav et Mélanie qui ont rapporté leur quota de bonne humeur.
- Merci à Sandrine à qui j'ai eu le plaisir d'encadrer pendant ma troisième année de thèse. Elle a été une stagiaire formidable et digne de confiance, et sa bonne humeur et son écoute ont fait d'elle une excellente stagiaire.

Je remercie également chaque membre qui est passé dans l'équipe :

- Seham qui m'a appris à maîtriser la RT-qPCR et avec qui j'ai eu le plaisir d'écrire une revue.
- Amina, post-doc à qui j'ai pu demander conseil et qui a été disponible pour m'aider à tout moment pendant mes stages et les deux ans qu'on s'est côtoyé.
- Elsa puisque ses travaux de thèse sont à l'origine de mon projet. Un grand merci pour son soutien, ses conseils et sa bonne humeur pendant les années travaillées ensemble.
- Julien qui m'a également formé et pour son aide technique pendant ma thèse. J'ai partagé des bons moments avec lui grâce à son écoute et sa bonne humeur.

- Je remercie Guillaume, qui m'a beaucoup écouté et conseillé, et pour son aide précieuse avec les Western Blot.

Merci aux différents membres de l'équipe de David Bernard avec qui nous avons partagé l'étage, pour leurs disponibilité et aides à tout moment.

- Marine et Audrey pour leur bonne humeur pendant ces années. Merci pour leurs disponibilités, pour l'aide et pour tous les conseils précieux qu'elles ont pu me donner et qui m'ont permis de développer des aspects de mon projet. Je les remercie également pour avoir pris le temps de lire ma thèse.
- Merci à Mylène et David V. pour leurs conseils lors de notre arrivée au CRCL et durant les années suivantes.
- Je remercie également Christopher, Xingjie, mon voisin Dorian, Delphine, Nadine et Anda pour les agréables moments vécus dans le laboratoire. Merci à tous pour les pauses de midi pleines de discussions et d'activités intéressantes. Merci pour les repas et les bières partagées.

Je remercie également nos voisines de culture Julie, avec qui je partage une passion pour Edith Piaf, et Ebticem avec qui j'ai pu également passer de bons moments.

Merci à Nadine et Manon, qui nous ont beaucoup aidé dans l'élevage de nos différentes lignées.

Merci aux gestionnaires, Nadia et Christelle. Merci à Cathy, Julie, Blandine et Claire qui ont toutes été toujours disponibles.

Merci à Romain, Matthieu, Florie, Gweltaz, Aurora et Elise, mes collègues de Master et laboratoire.

Je remercie mes parents qui m'ont beaucoup soutenu depuis mon arrivé en France. Ils m'ont aidé tout au long de mes études et m'ont encouragé pendant ma thèse. Merci également à mes frères Abel et Christian.

Enfin, merci à Clémentine pour son aide précieuse dans le laboratoire. Mais aussi pour sa patience et son soutien pendant la fin de ma thèse puisqu'elle a supporté les horaires aléatoires d'un thésard, et a été une aide précieuse pendant la rédaction de ma thèse. Merci beaucoup.

Abréviations

4F2hc (SLC3A2) : Solute carrier family 3 member 2
Adam10 : A disintegrin and metallopeptidase domain 10
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF1/2 : Activating function 1/2
Aicda : Activation-induced cytidine deaminase
Anxa10 : Annexin A10
AOM : Azoxymethane
APC : Adenomatous polyposis coli
APCDD1 : APC down-regulated 1
Atoh1 : Atonal bHLH transcription factor 1
bHLH : Basic helix-loop-helix
Bmi1 : Bmi1 polycomb ring finger oncogene
BMP : Bone morphogenic protein
BMPR : Bone morphogenic protein receptor
BRCA 1 : Breast cancer 1
CBCC : Crypt basal Columnar cell
CD133 (Prom1) : Prominin 1
CK1 α : Casein Kinase 1 α
CoA : Coactivator
CoR : Corepressor
Cox : Cyclooxygenase
CRC : Colorectal cancer
CRD : Cystein rich domain
Cxcr5 : Chemokine C-X-C motif receptor 5
DBD : DNA binding domain
DCKL1 : Double-cortin-like kinase 1
Dio : Deiodinase iodothyronine
DKK : Dickkopf
DLL 1 : Delta-like 1
DR4 : Direct repeat 4
DSS : Dextran sulfate sodium
DVL : Dishevelled
EGF : Epidermal growth factor
ELF3 : E74-like factor 3
EphB3 : Eph receptor B3
Expi : Extracellular proteinase inhibitor
FAP : Familial adenomatous polyposis
Fzd : Frizzled
Gfi1 : Growth factor independent 1
Gli1 : GLI-Kruppel family member GLI1
GSK3 β : Glycogen synthase kinase β
HBD : Hormone binding domain

HCC : Hepatocellular carcinoma
Hes : Hairy and enhancer of split
Hey 1 : Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1
Hhip : Hedgehog interacting protein
Hopx : HOP homeobox
HPGDS : Hematopoietic prostaglandin D synthase
HT : Hormones thyroïdiennes
Jag : Jagged 1
K-ras : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Klf4 : Kruppel like factor 4
LAT : Large neutral amino acid transporter
LBD : Ligand binding domain
LEF : Lymphoid enhancing factor
Lgr : Leucine rich repeat containing G
Lrig1 : Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
LRP : Low-density lipoprotein receptor-related protein
Mam : Mastermind
Math1 : Mouse atonal homologue 1
MCT : Monocarboxylate transporter
Min : Multiple intestinal neoplasia
mTert : Mouse telomerase reverse transcriptase
Ngn3 : Neurogenin 3
NHR : Nuclear hormone receptor
NICD : Notch intracellular domain
Nkx2.2 : Nk2 homeobox 2
OATP : Organic anion transporting polypeptides
Olfm 4 : Olfactomedin 4
Pax : Paired box 6
Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1
Pou2f3 : POU class 2 homeobox 3
Ptch1 : Patched 1
PTU : Propylthiouracile
RBP- κ : Recombination signal binding protein for immunoglobulin Kappa J region
RNF43 : ring finger protein 43
RSPO : R-spondin
RXR : Retinoid X receptor
sFRP : Secreted frizzled-related protein
Shh : Sonic hedgehog
SLC16A10 : Solute carrier family 16 member 10
Smad4 : Smad family member 4
Smo : Smoothened
SOST : Sclerostin
Sox : SRY-box17
Spdef : SAM pointed domain containing ETS transcription factor
SRY : Sex determining region Y
SUFU : Suppressor of fused

TCF : T-cell factor
TEM : Transition épithelio-mésenchimaleuse
TGFRBII : Transforming growth factor receptor B II
TGF β : Transforming growth factor β
THRA : Thyroid hormone receptor A
TRE : Thyroid response element
TRH : Thyrotropine-releasing hormone
TRMP5 : Transient receptor potential channel subfamily M member 5
TSH : Thyroid stimulating hormone
WFDC18 : WAP four-disulfide core domain 18
Wif1 : Wnt inhibitory factor 1
Wise (Sostdc 1) : Sclerostin domain containing 1
WT : Wild-type
ZNR3 : Zinc and ring finger 3
 β -Trcp : β -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase

Figures et tableaux

- **Figure 1** : Organisation de l'épithélium intestinal dans l'intestin grêle et dans colon
- **Figure 2** : La voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine
- **Figure 3** : La voie de signalisation Notch
- **Figure 4** : La voie de signalisation BMP
- **Figure 5** : La voie de signalisation Sonic Hedgehog
- **Figure 6** : Activité des voies de signalisation et expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans l'axe crypto-villositaire
- **Figure 7** : Organisation d'une crypte de Lieberkhün
- **Figure 8** : Représentation des différents signaux nécessaires à la formation des cellules de l'axe crypto-villositaire
- **Figure 9** : Schématisation de la synthèse des hormones thyroïdiennes
- **Figure 10** : A) Actions des transporteurs d'hormones thyroïdiennes B) Action des déiodinases
- **Figure 11** : A) Structures et isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes fonctionnels B) Organisation des sites TRE (Thyroid Response Element) C) Mécanismes d'action des TRs
- **Figure 12** : Actions non génomiques des hormones thyroïdiennes.
- **Figure 13** : Action de TR α 1 sur les voies Wnt et Notch
- : Séquence adénome-adénocarcinome
- **Figure 14** : Schématisation des mutations touchant le gène Apc chez la souris
- **Figure 15** : Développement tumoral chez les souris Apc^{1638N/+} et *vil*-TRa1/Apc^{1638N/+}
- **Figure 16** : Origines de l'hétérogénéité tumorale
- **Figure 17** : Caractéristiques moléculaires des six sous-groupes de la classification CCMS

- **Figure 18** : Caractéristiques biologiques et moléculaires des quatre sous-groupes de la classification CMS
- **Figure 19** : Schéma représentant les similitudes entre les sous-groupes décrits par les différentes classifications
- **Figure 20** : Développement tumoral chez les souris $Apc^{1638N/+}$ et $vil-TRa1/Apc^{1638N/+}$.
- **Tableau n°1** : Mécanismes d'action des anticorps utilisés dans la thérapie ciblée
- **Tableau n°2** : Résumé des différentes mutations Apc générées chez la souris.

INTRODUCTION

**Première partie : L'épithélium
intestinal, un tissu en constant
renouvellement**

I. Structure de l'intestin chez les mammifères

L'intestin est le dernier organe du système digestif contribuant à la digestion des aliments pour permettre l'absorption des nutriments. Cet organe complexe est composé de deux grandes parties : l'intestin grêle et le colon. L'intestin grêle est composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon ; et le colon, du colon ascendant, du colon transverse et du colon descendant. L'intestin est composé de trois couches de tissus : la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse, la couche la plus proche de la lumière intestinale. C'est dans cette dernière que se trouve l'épithélium intestinal, un revêtement de feuillet de cellules polarisées et organisées en colonne (Randall et al., 2002). La structure et la composition cellulaire de l'épithélium dans l'intestin grêle et dans le colon seront décrites par la suite.

A) L'intestin grêle

1) Les cryptes de Lieberkühn

C'est dans la muqueuse que des invaginations se forment pour donner naissance aux cryptes de Lieberkühn. Elles sont décrites comme des compartiments de prolifération dû à la présence de cellules souches permettant le renouvellement de l'épithélium intestinal. (Clevers, 2013) (Figure 1). Deux types de cellules souches ont été décrits jusqu'à présent. Tout d'abord, les cellules dites CBC (de l'anglais Crypt Basal Columnar) que l'on retrouve au fond de la crypte et qui ont été caractérisées comme « cellules souches actives ». Les CBC donneront naissance à tous les types cellulaires présents dans l'épithélium intestinal (Beumer and Clevers, 2016). Ensuite, nous avons les cellules souches en positions « +4 » en partant de la base des cryptes, qui sont décrites comme cellules « quiescentes » et qui sont activées lors de blessures ou d'endommagements (Takeda et al., 2011; Tian et al., 2011). La division des cellules souches donne naissance à des cellules filles qui prolifèrent rapidement. Ces cellules dites progénitrices ou à amplification transitoire (Transit Amplifying) se trouvent au-dessus de la position « +4 » et leur processus de

prolifération, de différenciation, et de migration constitue la base du renouvellement continu de l'épithélium permettant de remplacer les cellules endommagées ou exfoliées dans la lumière intestinale (Yousefi et al., 2017). En effet les progéniteurs migrent le long de l'axe cryptovillositaire pour se différencier et donner naissance aux cellules présentes dans les villosités (Beumer and Clevers, 2016) (Figure 1). Un autre type de cellule est présent au fond de la crypte, ce sont les cellules de Paneth. Nommées ainsi d'après le médecin Joseph Paneth, elles sont volumineuses et de forme pyramidale, et sont les seules cellules différenciées se trouvant à proximité des cellules souches. Elles présentent des granules contenant du lysozyme et d'autres peptides comme les défensines ou les cryptidines qui ont pour rôle de protéger la muqueuse contre les micro-organismes pathogènes présents dans la lumière intestinale (Clevers and Bevins, 2013). Ces cellules se renouvèlent tous les 30 jours environ tandis que les autres cellules de la villosité ont une durée de vie d'approximativement 7 jours (Clevers and Bevins, 2013).

2) La villosité

Les cellules différenciées sont classées en deux grands groupes: **le lignage sécrétoire** et le **lignage absorptif** (Beumer and Clevers, 2016) (Figure 1). Parmi le lignage sécrétoire se trouve : *les cellules de Paneth* qui se retrouvent exclusivement dans les cryptes (Clevers and Bevins, 2013); *les cellules entéroendocrines* ou *neuroendocrines* représentant 1% des cellules de l'épithélium intestinal et qui maintiennent le fonctionnement intestinal grâce à la sécrétion spécifique d'hormones peptidiques ; et *les cellules de Goblet* (dites cellules caliciformes) qui grâce à la sécrétion de mucine vont, d'une part permettre et maintenir la migration et l'expulsion correcte du contenu de la lumière intestinale et d'autre part, protéger les cellules épithéliales contre les dommages mécaniques ou chimiques. Ces dernières représentent 4% de la population au niveau du duodénum et peuvent atteindre les 16% au niveau du colon descendant (van der Flier and Clevers, 2009; Scoville et al., 2008). Elles sont renouvelées tous les 6-7 jours approximativement (Barker et al., 2010). Un quatrième type de cellule a été décrit, *les cellules Tuft*, dont le nom a évolué pendant les 60 dernières années (« peculiar », « fibrillovesicular »,

« caveolated », « brush », « tuft »)(Gerbe et al., 2012) . Elles représentent 0.4% des cellules de l'épithélium intestinal (Gerbe et al., 2012) et possèdent des microfilaments du côté apical et un système tubulo-vésiculaire très développé dans le cytoplasme du côté apical (Gerbe et al., 2011; Hoover et al., 2017). Bien que leur fonction soit sujette à controverse, de nos jours elles sont décrites comme chimio-sensorielles du microenvironnement de la lumière intestinale (Gerbe et al., 2012) .

En ce qui concerne la lignée absorptive, un seul type cellulaire est présent, les cellules dites entérocytes. Ces cellules représentent 80% de l'épithélium intestinal et vont permettre l'absorption et le transport de nutriments grâce à leur forte polarisation et à leur bordure en brosse présente du côté apical (van der Flier and Clevers, 2009).

B) Le colon

Contrairement à l'intestin grêle, le colon ne présente pas de villosité. On retrouve les mêmes types cellulaire décrits dans l'intestin grêle à l'exception des cellules de Paneth et la population de cellules souches quiescente qui n'a pas été décrite dans le colon. (Medema and Vermeulen, 2011). La proportion des cellules est également différente ; en effet les cellules différenciées sont en plus grand nombre dans le colon que dans l'intestin grêle. (Barker et al., 2009; van der Flier and Clevers, 2009; Gerbe et al., 2011) (Figure 1)

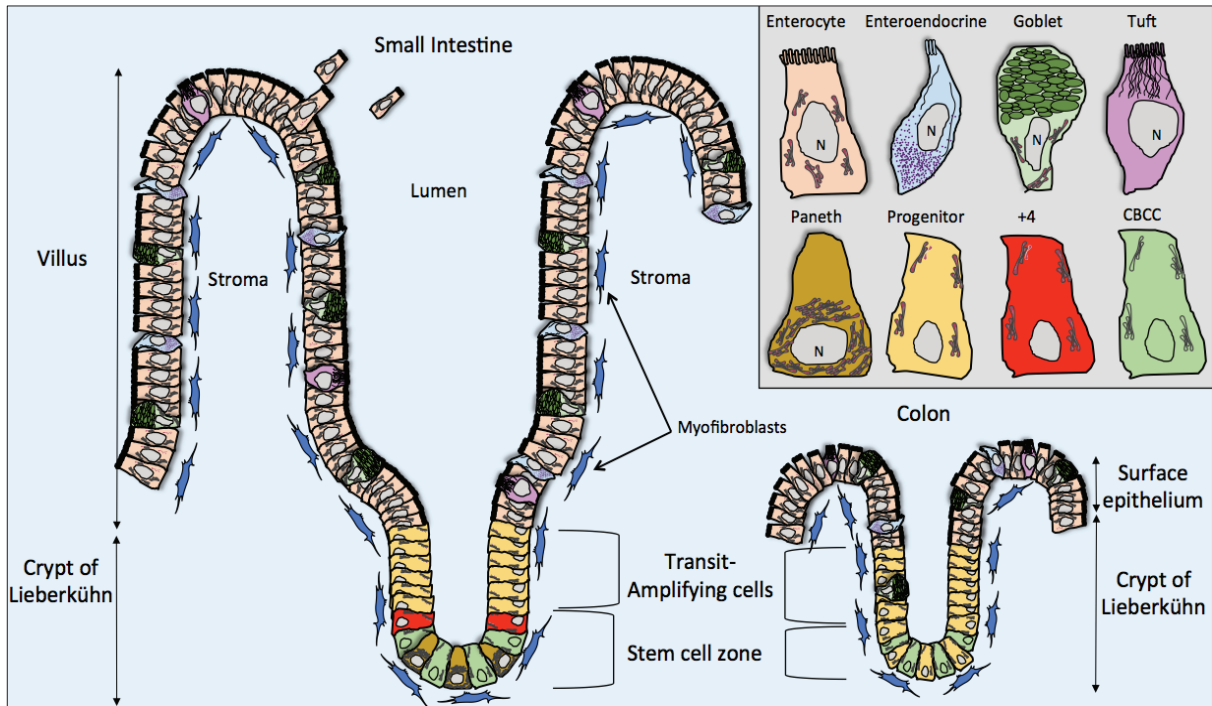


Figure 1 : Organisation de l'épithélium intestinal dans l'intestin grêle et dans colon.

Les cryptes de Lieberkühn sont constituées de cellules de Paneth, de cellules souches CBCC situées au bas de la crypte et de cellules souches situées en position « +4 ». Au-dessus de ces dernières, on trouve les cellules progénitrices qui prolifèrent et se différencient au cours de leur migration le long de la villosité. Le colon se différencie de l'intestin grêle par l'absence de villosités, de cellules de Paneth et de cellules souches en « +4 ».

II. Voies de signalisation impliquées dans le contrôle et régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal

L'homéostasie et le renouvellement continu du tissu épithélial dépendent de la fine régulation de plusieurs voies de signalisation. Les différentes voies de signalisation et leurs implications dans l'organisation du tissu seront détaillées par la suite.

A) Voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie intestinale

1) La voie de signalisation Wnt/ β -caténine

a) Description

La voie Wnt est une voie très conservée entre les différentes espèces, ce qui montre l'importance de celle-ci pour les différentes fonctions qu'elle accomplit. Elle est active de manière ubiquitaire dans les organes à renouvellement constant comme l'intestin et la peau (Kretschmar and Clevers, 2017). Elle permet de structurer correctement les tissus pendant le développement (van Amerongen and Nusse, 2009) et elle permet le maintien de l'architecture tissulaire à l'état l'adulte. Tout cela se fait en régulant des processus importants tels que la prolifération cellulaire (Niehrs and Acebron, 2012), le cycle cellulaire, la division cellulaire ainsi que la biologie des cellules souches (Nusse and Clevers, 2017; Sawa, 2012). Dix-neuf gènes Wnt sont présents chez les mammifères et l'inactivation de chacun de ces gènes conduit à des phénotypes divers selon la localisation de leurs expressions (Nusse and Clevers, 2017). Par exemple, des souris mutantes pour le ligand Wnt1 présentent des défauts au niveau du cerveau (McMahon 1992) tandis que chez des mutants pour Wnt4, le développement du rein est très affecté (Stark et al., 1994). Les ligands Wnt sont des protéines secrétées qui se fixent au complexe des récepteurs Frizzled (FZD) et au récepteur lipoprotéine 5/6 (LRP5/6) (Lipoprotein receptor-related protein 5/6). Les FZD possèdent 7 domaines transmembranaires et un domaine N-terminal extracellulaire riche en cystéines (CRD) (Nusse and Clevers, 2017) qui interagit avec le domaine C-terminal des ligands (Janda et al., 2012). Je décrirai dans les paragraphes suivants les mécanismes d'activation et d'inactivation de cette voie.

Wnt OFF. La β -caténine est un acteur et un co-régulateur transcriptionnel clé de cette voie (Kretschmar and Clevers, 2017). En absence de ligands Wnt, la voie est inactive et la β -caténine est présente dans le cytoplasme en très faible quantité. Un complexe dit « de destruction », composé de la protéine tumeur-suppresseur APC (de l'anglais adenomatous polyposis coli), de l'Axine, de la Kinase caséine 1 α (CK1 α) (Casein Kinase), et de la kinase glycogène synthase 3 β

(GSK3 β), va se charger de séquestrer la β -caténine, et les deux kinases vont à leurs tours phosphoryler la β -caténine. Ensuite, la ligase β -TRCP (β -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase), qui comme son nom l'indique est une sous-unité de l'ubiquitine ligase E3, a pour rôle d'ubiquitinyler et d'emmener la β -caténine au protéasome pour sa dégradation. De cette manière, la β -caténine ne peut donc atteindre le noyau et la transcription de gène cible est ainsi inactivée (Figure 2).

Wnt ON. Les ligands sécrétés Wnt vont se fixer aux récepteurs membranaires FZD et aux co-récepteurs LRP5/6 qui changent de conformation pour permettre l'activation de la voie. La protéine DVL (dishevelled) est recrutée au niveau du domaine cytoplasmique de FZD et par la suite GSK3 β et CK1 vont phosphoryler l'extrémité de LRP et faciliter l'interaction Axine-LRP. Le complexe de dégradation est ainsi inhibé et la β -caténine peut être transloquée dans le noyau. Elle remplace alors le répresseur Groucho, et forme un complexe avec des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-cell Factor/Lymphocyte enhancer factor) pour activer la transcription de gènes cibles (Kretzschmar and Clevers, 2017) (Figure 2). L'intensité du signal et l'activité transcriptionnelle de Wnt/ β -caténine sont dépendants du contexte. En effet, il a été suggéré que des faibles doses de β -caténine nucléaire sont suffisantes pour induire son action. De plus, l'expression de gènes cibles spécifiques au type cellulaire est dépendant des variants d'épissages des facteurs TCF/LEF présents dans le complexe transcriptionnel (Kretzschmar and Clevers, 2017).

b) Antagonistes et agonistes de la voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine possède des régulateurs extracellulaires et membranaires permettant la fine régulation de celle-ci. Des molécules extracellulaires telles que les protéines sécrétées sFRPs (Secreted frizzled-related proteins) décrites comme des modulateurs de la voie Wnt, sont capables de lier les ligands Wnt et ainsi empêcher l'activation de la voie (Cruciat and Niehrs, 2013; Kawano and Kypta, 2003). Mais certaines des sFRPs sont aussi susceptibles de stabiliser la β -caténine à travers les récepteurs FZD, c'est le cas par exemple de sFRP2. (Kress et al., 2009;

Skah et al., 2015). A cette liste s'ajoutent, le facteur inhibiteur de la voie Wnt WIF1 (Wnt inhibitory factor 1) capable de se lier aux ligands Wnt grâce à deux domaines distincts (Hsieh et al., 1999; Kerekes et al., 2015), mais également Dickkopf (Dkk), protéine de la famille WISE/SOST, qui se lie au LRP et bloque la formation du complexe FZD-LRP (Clevers and Nusse, 2012). La protéine APC sous-régulée, APCDD1 (APC down-regulated 1) été initialement isolée dans des cellules de CRC SW480 (Takahashi et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* dans des cellules HEK293, qu'elle peut inhiber la voie Wnt en se liant aussi bien au ligand qu'au récepteur LRP (Cruciat and Niehrs, 2013; Shimomura et al., 2010) (Figure 2). *In vivo*, elle empêche la signalisation de la voie Wnt pendant la génération de neurones à partir de progéniteurs dans le système nerveux pendant le développement de l'embryon la poule et du xenope, (Shimomura et al., 2010). Il a été montré dans des cellules Hela que la β -caténine interagit avec le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine au niveau de la membrane plasmique et participe ainsi aux jonctions adhérentes (Ozawa et al., 1989). Cette interaction régule de manière passive la voie en diminuant le niveau de la β -caténine cytoplasmique disponible (hüelsken et al., 1994).

Les agonistes, de manière opposée vont renforcer le signal de la voie Wnt, comme par exemple la protéine sécrétée Norrin, qui est capable d'activer la voie Wnt en se liant au complexe FZD4-LRP5 en absence de ligand (Cruciat and Niehrs, 2013; Kretschmar and Clevers, 2017). Une deuxième protéine sécrétée, la R-spondine, a été montré comme étant co-exprimée avec des agonistes et des ligands Wnt (Kazanskaya et al., 2004). Des études ont décrit que la protéine R-spondine pouvait se lier au domaine N-terminal des récepteurs membres de la famille LGR (Leucine rich repeat containing G) (Schuijers and Clevers, 2012; Wang et al., 2013). Cette interaction permet de lier et d'inactiver la protéine ligase transmembranaire ZNRF3 (E3 ubiquitin ligases zinc and ring finger 3) et la protéine RNF43 (ring finger protein 43), toutes deux décrites comme antagonistes de la voie Wnt puisqu'elles ciblent la β -caténine et emmènent les récepteurs frizzled à leur dégradation par le protéasome (Hao et al., 2012; Koo et al., 2012; Yan et al., 2017) (Figure 2). De manière intéressante, LGR5 un des membres de la famille LGR, a

été caractérisé comme un gène cible de la voie Wnt et comme marqueur de cellules souches dans plusieurs tissus présentant un auto-renouvellement très actif (Barker and Clevers, 2010).

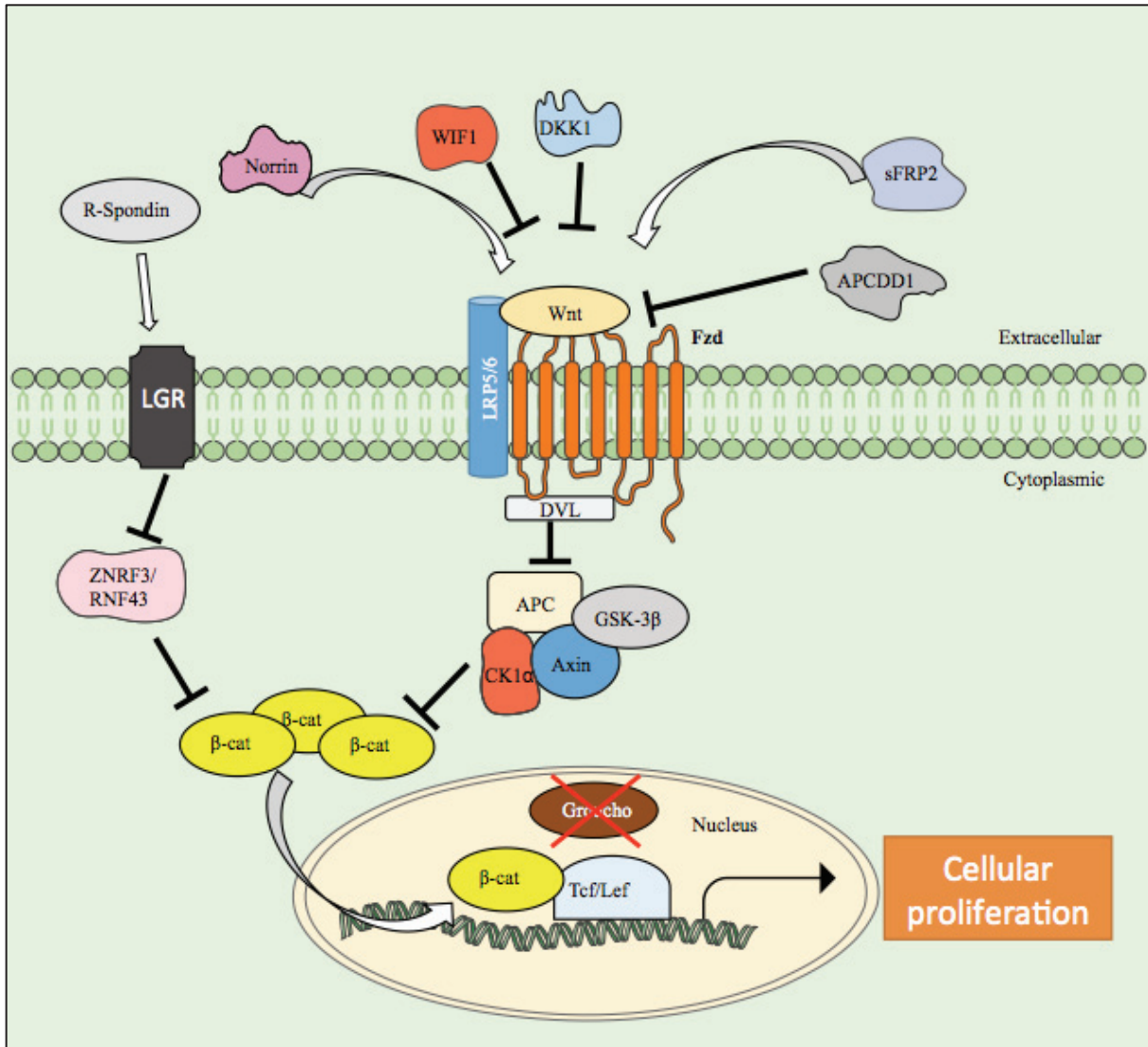


Figure 2 : La voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

La présence de ligand permet l'inactivation du complexe de destruction qui en absence de ligand a pour rôle de dégrader la β -caténine par le protéasome. La β -caténine est donc transloquée dans le noyau et en association au complexe Tcf/Lef ils initient la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire tels que *CyclinD1* et *c-Myc*. Des agonistes agissent en stabilisant la β -caténine tandis que des antagonistes empêchent la liaison ligand/récepteur.

2) La voie de signalisation Notch.

a) Description

La voie de signalisation Notch est impliquée dans la régulation de plusieurs processus comme la régulation des cellules souches, de la morphogenèse cardiaque, et est impliquée dans certaines pathologies (Bray, 2016). L'activation du signal Notch requiert l'interaction entre deux cellules : une cellule qui émet un signal grâce à l'expression des ligands de Notch (Jagged1, Jagged2, Delta-like1/3/4) et une cellule qui reçoit le signal à travers les récepteurs à sa surface (Notch 1-4) (Demitrack and Samuelson, 2016; Kopan and Ilagan, 2009). Après l'interaction récepteur-ligand, un premier clivage du récepteur réalisé par ADAM10, une protéine membre de la famille des métalloprotéases, permet de détacher la partie extracellulaire. Dans un deuxième temps, le complexe γ -sécrétase agit en exerçant un deuxième clivage au niveau cytoplasmique et libère le domaine intracellulaire (NICD). Celui-ci est transloqué dans le noyau et interagit avec un complexe activateur de transcription dont font partie les protéines RBP-J κ et Mastermind (Mam). Parmi les gènes cibles de cette voie, on trouve les gènes *Hes1* et *Olfm4* (Demitrack and Samuelson, 2016). En absence de NICD le complexe réprime la transcription des gènes cibles (Figure 3).

b) Antagonistes et agonistes

La protéine NUMB est un antagoniste naturel qui inhibe la voie Notch en permettant la dégradation du NICD par le protéasome (McGill et al., 2009; Yang et al., 2011) (Figure 3). D'autres antagonistes synthétiques ont été élaborés mais ils ne seront pas cités.

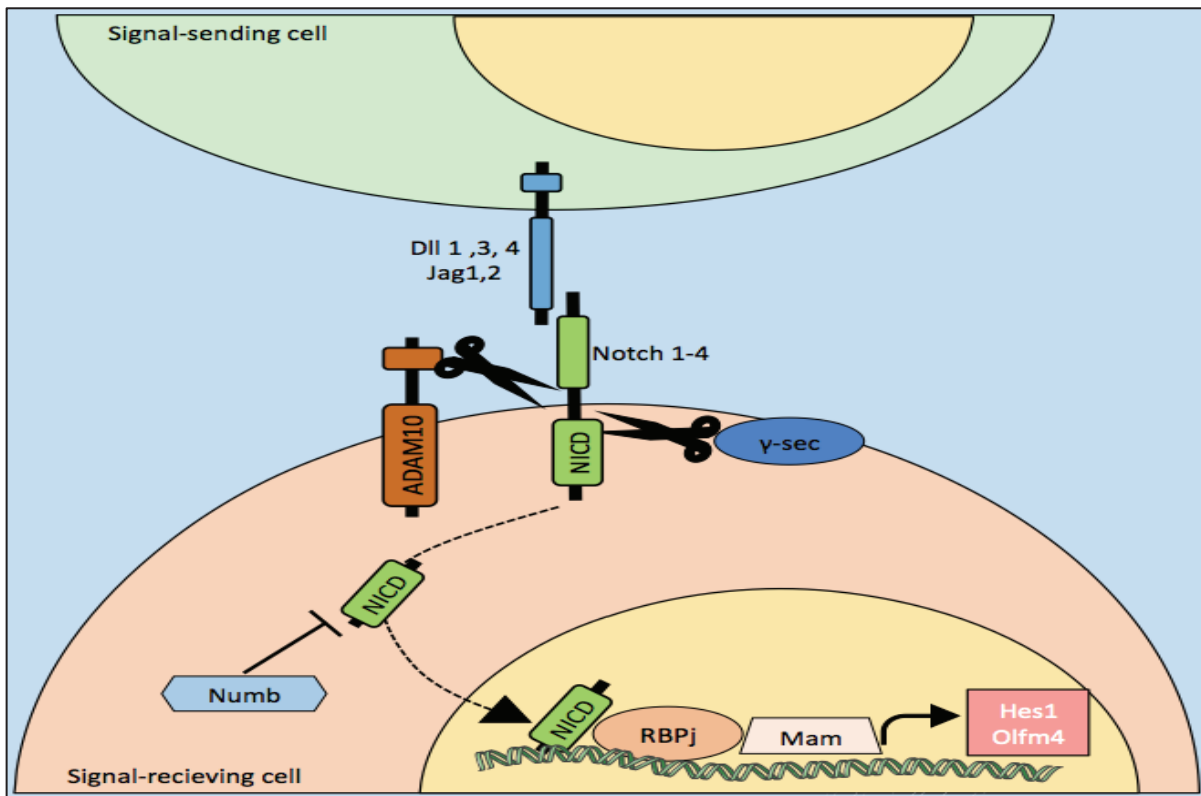


Figure 3 : La voie de signalisation Notch.

Le contact entre deux cellules permet l'interaction ligand-récepteur et le clivage de ce dernier. Le domaine intracellulaire NICD est libéré et transloqué dans le noyau où son interaction avec un complexe activateur de transcription permet l'activation de la voie Notch. NUMB empêche l'activation de la voie en permettant la dégradation au protéasome de NICD. Adapté à partir de Demitrack and Samuelson, 2016.

3) La voie de signalisation BMP : Bone Morphogenic Protein

a) Description

La voie BMP joue un rôle important pendant le développement puisqu'il régule des processus tels que la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire, et permet le maintien de l'homéostasie dans les tissus adultes (Wang et al., 2014). Les ligands BMPs appartiennent à la famille des facteurs de croissance (TGF β) et se lient au complexe des récepteurs de BMP de type 1 (BMPR1) ou de type 2 (BMPR2) qui sont des tyrosines kinases. BMPR2 phosphoryle et active BMPR1 qui à son tour phosphoryle les protéines SMAD 1, 5 ou 8. Ces phospho-smad coopèrent

avec SMAD4 pour former un complexe qui est transloqué dans le noyau, ce qui active la transcription de gènes cibles (Bertrand et al., 2012; Wang et al., 2014) (Figure 4).

b) Antagonistes et agonistes

On connaît principalement des antagonistes de la voie des BMPs tels que les protéines secrétées Noggin, Gremlin1, 2 et Chordin1 qui empêchent l'interaction ligand-récepteur (Mulloy and Rider, 2015) (Figure 4).

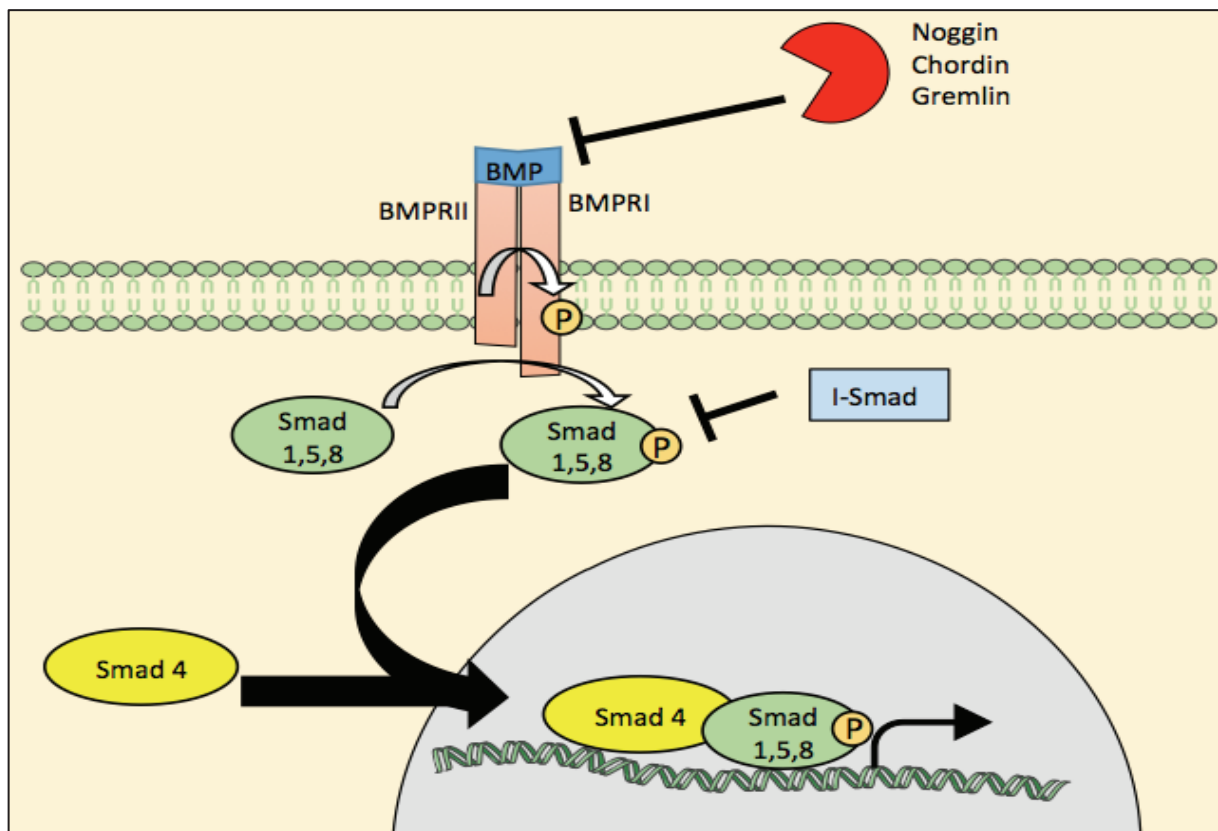


Figure 4 : La voie de signalisation BMP.

La présence de ligand sur le complexe des récepteurs permet la phosphorylation des protéines Smad 1, 5 et 8. Après translocation dans le noyau, l'association avec Smad4 permet l'activation de la transcription de gène cible. Des protéines telles que Noggin, Chordin et Gremlin inhibent la voie en séquestrant le ligand BMP.

4) *La voie de signalisation SHH : Sonic Hedgehog*

a) Description

La voie de signalisation SHH est un régulateur majeur de la différenciation cellulaire et de la prolifération cellulaire pendant le développement embryonnaire ainsi qu'à l'état adulte (Ramsbottom and Pownall, 2016). En absence de ligands tels que les glycoprotéines HH (SHH, DHH et IHH), la protéine transmembranaire Patched1 (PTCH1) inhibe l'activité de Smoothed (SMO) (Ramsbottom and Pownall, 2016). La protéine « Suppressor of Fused » (SUFU) forme un complexe de répression et fixe le facteur de transcription GLI au niveau du cytoplasme menant à sa dégradation par le protéasome. Cependant, en présence du ligand, l'inhibition de SMO par PTCH1 est levée, GLI peut donc être transloqué dans le noyau et active la transcription de gènes cibles impliqués dans la régulation de la voie elle-même, dans la prolifération ou encore dans l'angiogenèse. (Ramsbottom and Pownall, 2016; Rimkus et al., 2016) (Figure 5).

b) Antagonistes et agonistes

Une des protéines inhibitrices de la voie est HHIP, un facteur membranaire qui peut séquestrer SHH au niveau de la membrane et empêcher l'activation de la voie (Ramsbottom and Pownall, 2016). De nombreuses molécules inhibitrices ont été développées afin de cibler la voie SHH; principalement des inhibiteurs de GLI et de SMO, cependant je choisis de ne pas les développer (Rimkus et al., 2016) (Figure 5).

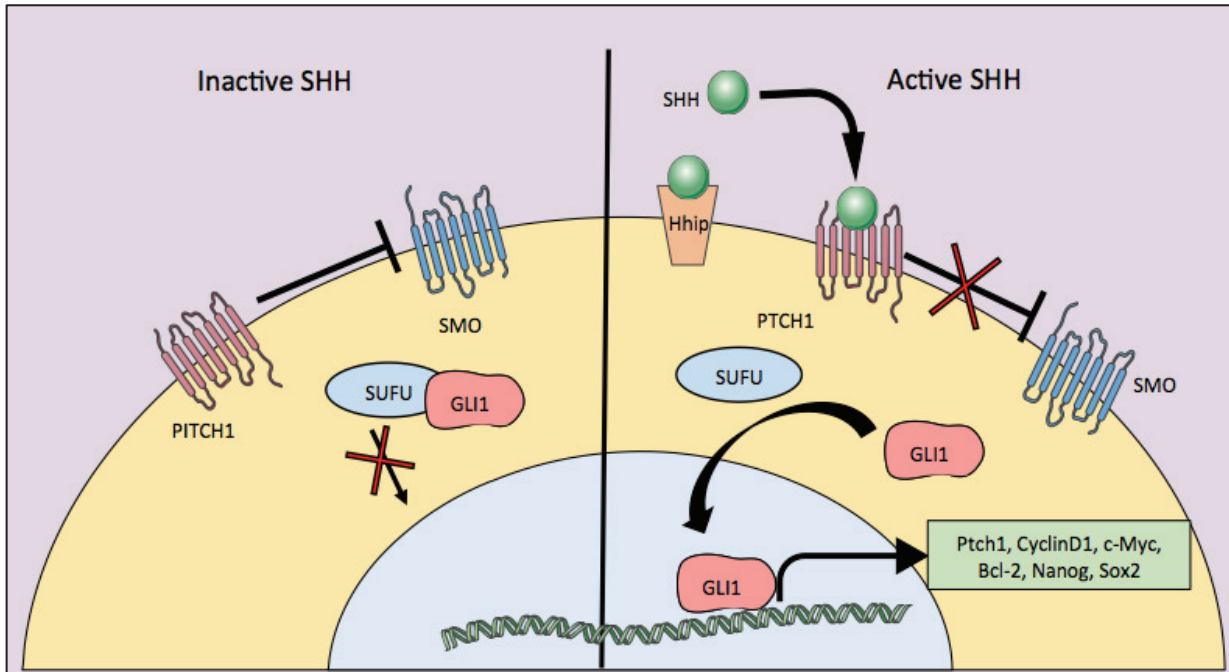


Figure 5 : La voie de signalisation Sonic Hedgehog.

En absence de ligand, PTCH1 inhibe SMO, et SUFU empêche la translocation de GLI1 dans le noyau et l'activation de la voie. En présence de ligand SHH, l'inhibition est levée et GLI1 peut activer la transcription de gène cible après translocation dans le noyau.

B) Contrôle et régulation du maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Comme mentionné précédemment, c'est une fine régulation entre ces différentes voies de signalisation qui assure le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Je décrirai par la suite cette régulation dans les différents compartiments.

1) Rôle des voies de signalisation Wnt et Notch

Tout d'abord un gradient d'activité Wnt est présent dans l'axe crypto-villositaire avec une forte activation dans le compartiment de prolifération (Kretschmar and Clevers, 2017) (Figure 6). En effet, la voie Wnt a été montrée comme étant actrice de la prolifération. Différentes expériences avec des mutants présentant des défauts au niveau de la voie Wnt montrent que ses altérations dans l'intestin conduisent à une perte des cryptes et à une augmentation du nombre de cellules différenciées, notamment des cellules entéroendocrines, dans les régions normalement peuplées par des cellules prolifératives (van Es et al., 2012; Fevr et al., 2007; Korinek et al., 1998). De plus, la surexpression d'un inhibiteur de la voie Wnt tel que DKK1 dans des souris transgéniques, conduit à une forte perturbation de la prolifération des cryptes intestinales adultes (Kuhnert et al., 2004; Pinto et al., 2003). Wnt permet donc le maintien du statut indifférencié et prolifératif des cellules (Kretschmar and Clevers, 2017). Tout comme la voie Wnt, la voie Notch est essentielle au maintien des cryptes intestinales. En effet, l'inhibition de la voie Notch dans l'intestin conduit à une différenciation rapide des cellules épithéliales en cellules de Goblet même si la voie Wnt reste active (Milano et al., 2004; Wong et al., 2004). Inversement, une suractivation de la voie Notch entraîne une délétion du lignage sécrétoire et une augmentation de la prolifération (Fre et al., 2005), montrant qu'une balance entre les voies Wnt et Notch est importante pour la régulation des cellules souches intestinales et de l'homéostasie (Tian et al., 2015) (Figure 6). Etant donné la proximité des cellules de Paneth avec les cellules souches, il avait été évoqué un possible rôle des cellules de Paneth dans le maintien de la niche des cellules

souches. En outre les cellules de Paneth secrètent des facteurs tels que Wnt3, EGF, et expriment le ligand de Notch DLL4. De plus la co-culture de cellules de Paneth avec des cellules souches CBC favorise la formation d'organoïdes à partir de CBCs *in vitro* (Clevers and Bevins, 2013; Sato et al., 2011). Cependant la suppression de cellules de Paneth dans les souris n'affecte ni l'activité des cellules souches ni l'homéostasie intestinale suggérant qu'il existe d'autres sources de ces facteurs que les cellules de Paneth pour le maintien de la niche (Durand et al., 2012; Kim et al., 2012; Yousefi et al., 2017).

2) Rôle des voies de signalisations BMP et SHH

De manière opposée, des voies contrebalancent et équilibrent les effets des voies Wnt et Notch. Il a été montré que l'inhibition de la voie Hedgehog entraîne une réduction des villosités et une hyper-prolifération de l'épithélium (Madison et al., 2005). Par ailleurs, la voie des BMPs est décrite comme un régulateur négatif des cryptes et est montrée comme active dans l'épithélium villositaire (Hallikas et al., 2006; van de Wetering et al., 1997). De plus, des inhibiteurs des BMPs sont exprimés au niveau des myofibroblastes du stroma situés à la base des cryptes. L'inhibition ou la délétion de BMPs entraîne une hyperprolifération et la formation de cryptes ectopiques (Haramis et al., 2004; He et al., 2004). Cependant BMP4 est aussi présent dans les cellules mésenchymateuses entourant les cryptes, surtout au niveau des cellules de Paneth, et au niveau des cellules présentes en position « +4 » (He et al., 2004). BMP permet donc de contrôler la taille des cryptes et le nombre de cellules souches (Haramis et al., 2004; He et al., 2004) (Figure 6). Par ailleurs des protéines ont été décrites comme jouant un rôle dans la migration et dans la position des différentes cellules de l'axe crypto-villositaire.

Chez la souris, la délétion des récepteurs EphB3 et EphB2 cibles de la voie Wnt conduit à la présence de cellules progénitrices et de cellules de Paneth dans les cryptes et les villosités, alors que celles-ci sont normalement situées que dans la crypte (Batlle et al., 2002; Xu et al., 1999). Cela montre que l'expression des EphB permet le correct positionnement des cellules dans la

crypte. De manière opposée, les ligands Ephrin-B ne sont présents que dans les cellules de la villosité, aidant à leurs migrations vers la villosité (Batlle et al., 2002; Scoville et al., 2008). L'ensemble de ces données montre qu'au sein de la crypte, une coopération entre plusieurs signaux est nécessaire pour maintenir des cellules à l'état indifférencié ainsi que des cellules à l'état différencié comme les cellules de Paneth.

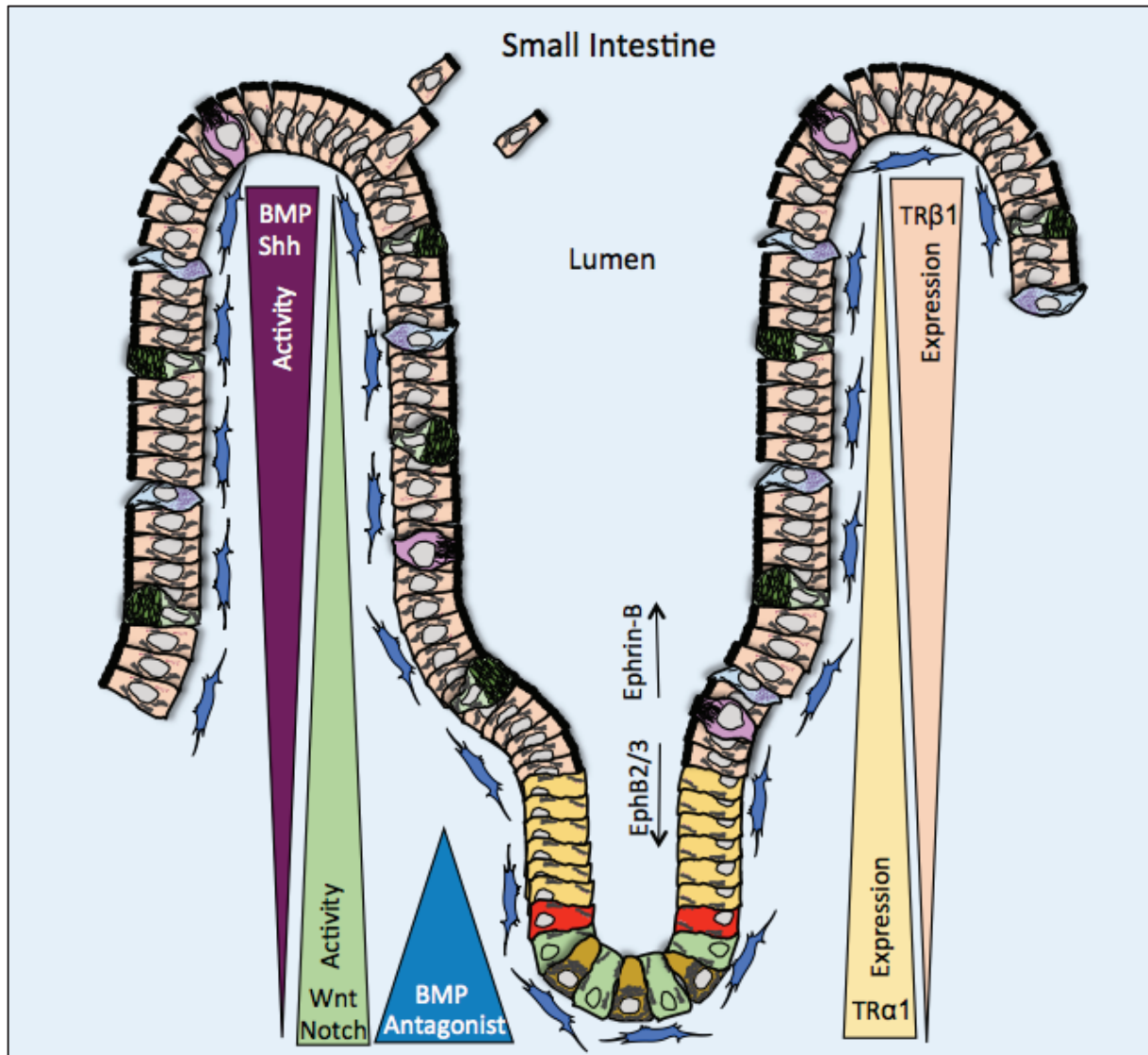


Figure 6 : Activité des voies de signalisation et expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans l'axe crypto-villositaire.

L'activité des voies Wnt et Notch est retrouvée majoritairement au niveau de la crypte intestinale permettant le maintien des cellules présentes dans celle-ci. De manière opposée, les voies BMP et Shh présentent une activité plus importante dans le compartiment de la villosité et permettent le maintien des cellules dans un état différencié. TRα1 et TRβ1 sont exprimés de manière respective au niveau des cryptes et des villosités.

C) La signature «souche» de l'épithélium intestinal

La présence de différents types de cellules souches au niveau des cryptes (CBC et « +4 ») a toujours été sujette à controverse, puisque deux théories plaçaient chacune de ces cellules comme responsables de la formation de toutes les cellules de l'épithélium intestinal. Des études ont pu démontrer qu'un gène cible de la voie Wnt (*Lgr5*) était exprimé au fond des cryptes dans les cellules CBC (Barker et al., 2007). Grâce à des expériences de suivi de lignage, il a pu être révélé que les cellules souches CBC *Lgr5*⁺ étaient à l'origine de toutes les cellules de l'épithélium intestinal, les cellules en position « +4 » incluses (Barker et al., 2007). Par ailleurs, plusieurs études ont décrit des marqueurs de cellules en position « +4 » tels que *Bmi1*, *mTert*, *Hopx*, *Lrig1* (Li et al., 2014; Montgomery et al., 2011; Powell et al., 2012; Sangiorgi and Capecchi, 2008; Yan et al., 2012). Cependant, au même moment *Lrig1* était décrit comme étant exprimé dans des cellules proliférant rapidement dans la crypte et même dans des cellules *Lgr5*⁺, remettant en question son rôle en tant que marqueur de cellules en position « +4 » (Wong et al., 2012) (Figure 7).

Finalement et de manière intéressante, les cellules en position « +4 » sont contrairement au CBC, résistantes aux radiations et capables de donner naissance à toutes les cellules de l'épithélium après détérioration due à des blessures (Takeda et al., 2011; Tian et al., 2011; Yan et al., 2012). Afin de déterminer les caractéristiques moléculaires des cellules souches *LGR5*⁺, des expériences de microarray ont été réalisées à partir de cellules souches exprimant ou non le marqueur *Lgr5*. Cela a permis de caractériser une signature des cellules souches intestinales associées à *Lgr5* (Muñoz et al., 2012). Cette signature a été un outil très intéressant pour le déroulement des travaux de ma thèse.

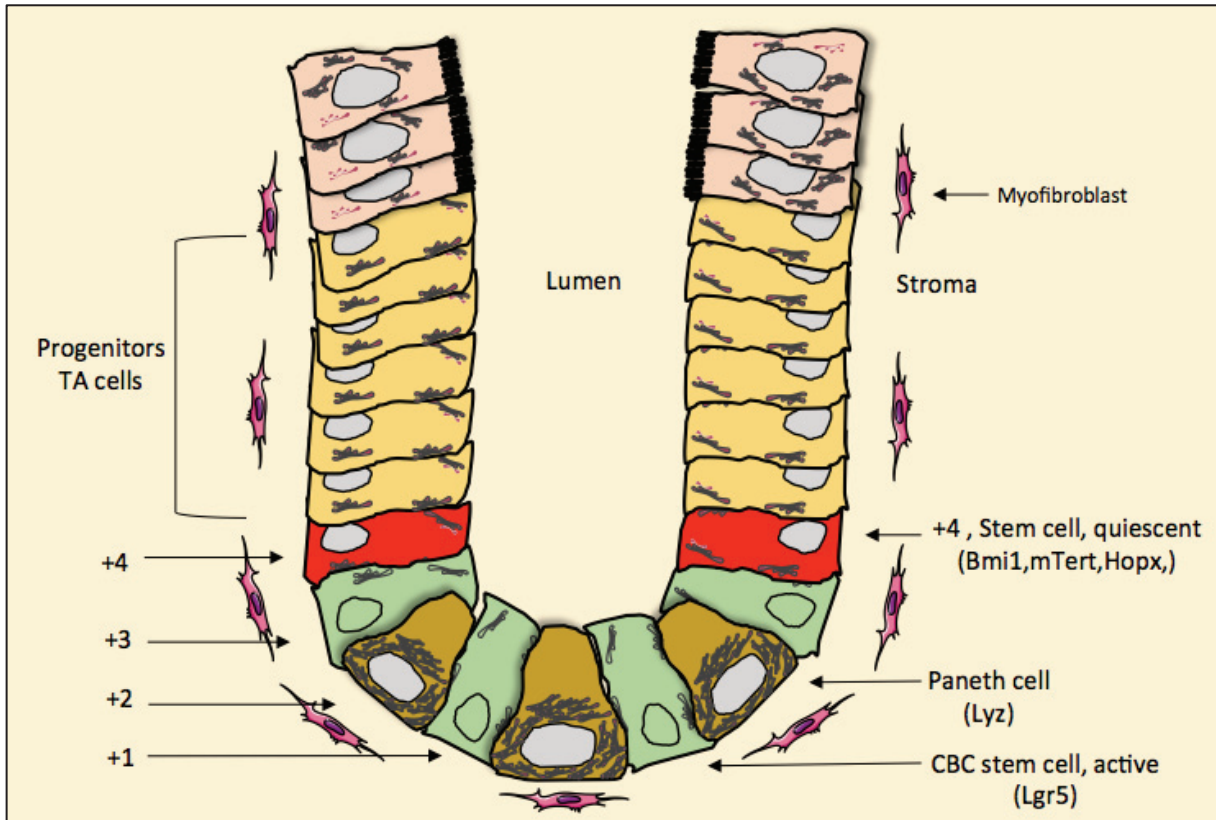


Figure 7 : Organisation d'une crypte de Lieberkühn.

Les cellules CBC localisées en bas de la crypte présentent les marqueurs *Lgr5*, tandis que les cellules en position « +4 » sont caractérisées par les marqueurs *Bmi1*, *mTert*, *Hopx*.

D) Signaux contribuant à la destinée cellulaire

Il a été montré que plusieurs facteurs de transcription sont essentiels pour la différenciation des lignages sécrétoire et absorptif. Je citerai donc les différents facteurs nécessaires au développement de chaque lignée.

Lignage absorptif : Cellules entérocytaires. Il a été montré que l'absence de *Math1* (homologue de *Atho1* chez l'homme) chez des souris conduit à la disparition de toutes les cellules du lignage sécrétoire mais est accompagné d'une forte augmentation du nombre de cellules entérocytaires (Yang et al., 2001). D'un autre côté, l'inactivation de *Hes1*, un facteur de transcription de la voie Notch et qui est connu pour réprimer *Math1*, conduit à l'augmentation de cellules de Paneth, de cellules de Goblet, et de cellules entéroendocrines tandis que le nombre de cellules entérocytaires chute considérablement (Jensen et al., 2000; Suzuki et al., 2005). *Math1* et *Hes1* sont donc nécessaires à la différenciation des lignées sécrétoires et absorptives respectivement. Des facteurs tels qu'*Elf3* et *Tgfbrii* ont été décrits comme essentiels pour le développement de cellules entérocytaires. En effet, il a été montré que des souris déficientes en *Elf3* développaient des entérocytes très peu différenciés (Ng et al., 2002), et que la surexpression de TGFBRII permettait de restaurer la différenciation des entérocytes dans ce même contexte (Flentjar et al., 2007). Tout ceci montre l'importance de ces deux facteurs pour la lignée entérocytaire (Figure 8).

Lignage sécrétoire : Cellules entéroendocrines. *Math1* est donc nécessaire pour la différenciation en lignage sécrétoire et *Gfi1* est un facteur de transcription dont l'expression est absente dans l'intestin d'embryon *Math1*^{-/-} montrant ainsi qu'il agit en aval de *Math1* (Yang et al., 2001). En outre, les souris *Gfi1*^{-/-} ne présentent aucune cellule de Paneth, mais une diminution du nombre de cellules de Goblet, et une augmentation de cellules entéroendocrines est observée (Shroyer et al., 2005). Neurogenin3 (*Ngn3*) est montré comme nécessaire à la formation de cellules entéroendocrines (Jenny et al., 2002; Mellitzer et al., 2010), et est trouvé fortement exprimé après délétion de *Gfi1* (Bjerknes and Cheng, 2010). Cette contrebalance est due au fait que *Gfi1*

réprime *Ngn3*. D'autres facteurs de transcriptions permettent la différenciation en cellules entéroendocrines, c'est le cas de *Pdx1*, *Pax4*, *Nkx2.2* et *Pax6* (van der Flier and Clevers, 2009) (Figure 8).

Cellules de Goblet. Comme décrit précédemment, *Gfi1* est nécessaire à leurs formations. Cependant d'autres facteurs ont également été montrés comme essentiels. En effet, la délétion du facteur de transcription *Klf4* provoque la disparition des les cellules de Goblet (Katz et al., 2002), et la surexpression du facteur de transcription *Spdef* (SAM pointed domain containing ETS transcription factor) conduit à l'augmentation du nombre de ces mêmes cellules au détriment des cellules de Paneth. En outre, *Spdef* a été montré comme nécessaire à l'activation de gènes associés aux cellules de Goblet (Noah et al., 2010) (Figure 8).

Cellules de Paneth. *Sox9*, un régulateur négatif de la voie Wnt, a été montré comme étant nécessaire à la maturation des cellules de Paneth. Tandis que l'absence de *Sox9* conduit à leurs disparitions (Bastide et al., 2007; Mori-Akiyama et al., 2007), l'induction de *Sox9* contribue à leur formation (Feng et al., 2013). Finalement l'absence de *Spdef* chez des souris provoque non seulement la perte de cellules de Goblet, mais aussi des cellules de Paneth (Gregorieff et al., 2009). Cependant la surexpression de *Spdef* diminue également le nombre de cellules de Paneth, par conséquent *Spdef* peut réguler positivement et négativement la différenciation en cellules de Paneth (Gregorieff et al., 2009) (Figure 8).

Cellules Tuft. Plusieurs marqueurs ont été proposés pour les cellules Tuft. Parmi eux la viline, la fibrine (Höfer and Drenckhahn, 1992), l' α -gustducine (Höfer et al., 1996), la lectine ulex europaeus 1 (Gebert et al., 2000; Gebhard and Gebert, 1999), la cytokeratine 18 (Höfer and Drenckhahn, 1996) et *Trmp5* (Bezençon et al., 2007). Cependant aucun de ces marqueurs n'a été démontré comme spécifique des cellules Tuft intestinales. De nos jours, *Dckl1* (ou *Dcamkl1*) est considéré comme un marqueur des cellules Tuft (Gerbe et al., 2009) tout comme les enzymes cyclooxygénases 1 et 2 (COX1 et COX2) et HPGDS (hematopoietic prostaglandin D synthase) (Gerbe et al., 2011, 2012). Des études décrivent les cellules Tuft comme des cellules souches

quiescentes car elles ne sont pas prolifératives et car des cellules exprimant *Dckl1* ont été retrouvées dans les cryptes en position « +4 » (Gagliardi et al., 2012; May et al., 2008, 2009). Cependant, *Dckl1* a aussi été retrouvé dans des cellules de la villosité, remettant en cause cette dernière hypothèse (Gerbe et al., 2011). Plusieurs études essaient donc de caractériser ces cellules et l'hypothèse de l'existence d'au moins deux sous-populations de cellules *Dckl1* semblerait prendre forme : (Gerbe et al., 2011; Leppänen et al., 2016; McKinley et al., 2017; Westphalen et al., 2014), une population différenciée et renouvelée tous les 7 jours environ et une autre population quiescente avec un temps de vie plus long (~ 3 mois) et qui serait capable d'initiation de cancer (Westphalen et al., 2014).

Les facteurs de transcription permettant le développement des cellules Tuft sont assez mal connus et définis. Une équipe a pu montrer que *Math1* était nécessaire à la formation de cellules Tuft les caractérisant ainsi comme des cellules de type sécrétoire (Gerbe et al., 2011). Cependant une autre équipe a montré la présence de ces mêmes cellules après délétion de *Math1* remettant en doute l'origine de ces cellules (Westphalen et al., 2014). De plus, la délétion de *Gfi1* et de *Spdef* ne perturbe pas la formation de ces cellules et bien que *Sox9* soit présent dans les cellules Tuft, son expression n'est pas nécessaire pour leur développement (Gerbe et al., 2011). Ces résultats les distinguent ainsi des cellules de Goblet et de Paneth. En outre, une équipe a montré que des souris KO pour *Pou2f3* (un facteur de transcription nécessaire pour le développement de cellules réceptrices du goût chez la souris) étaient incapables de développer des cellules Tuft (Ushiyama et al., 2016). Enfin, l'innervation neuronale de l'intestin favoriserait la survie des cellules *Dckl1+* *in vivo* et *in vitro* (Heanue and Pachnis, 2007; Westphalen et al., 2014) (Figure 8).

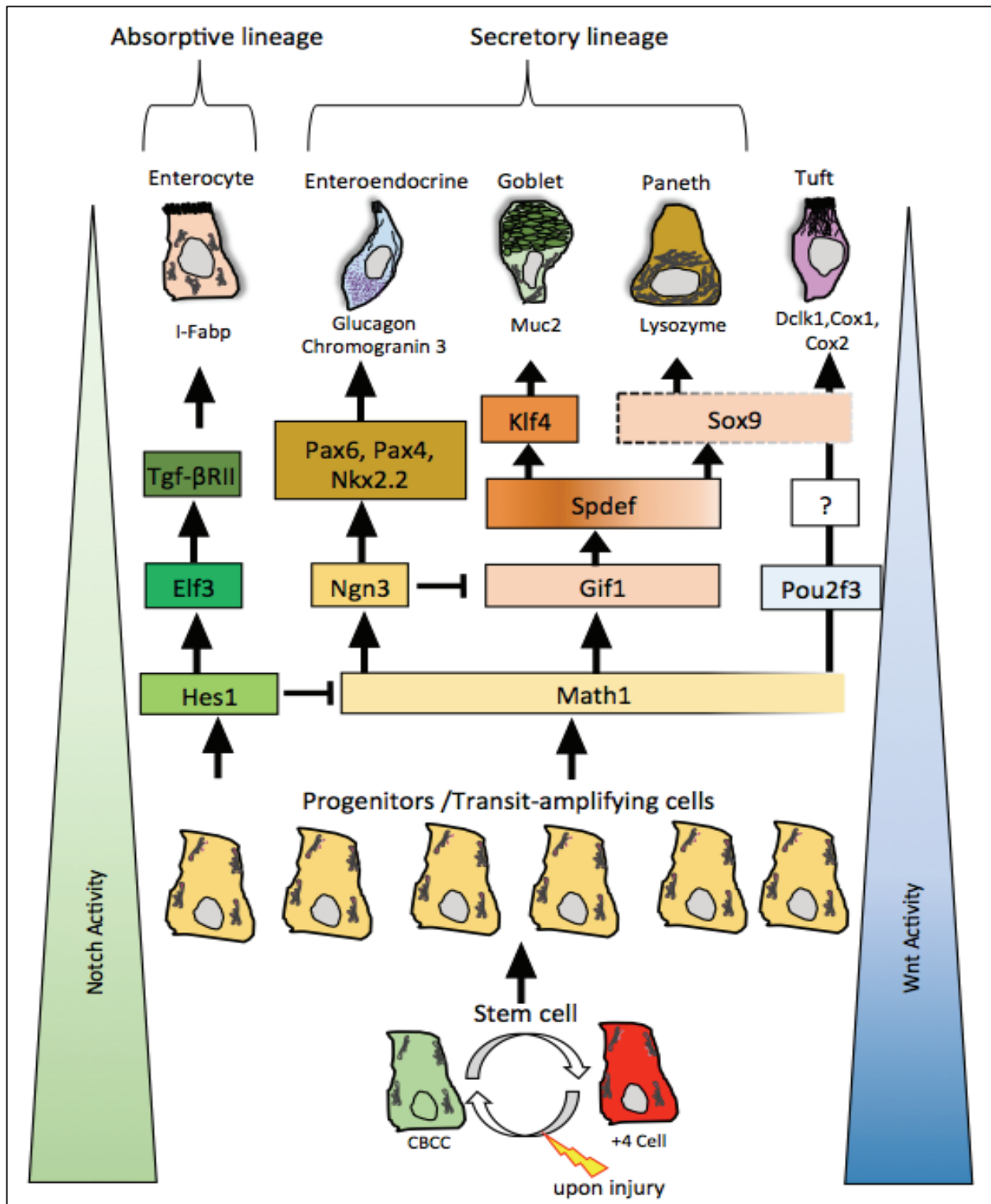


Figure 8 : Représentation des différents signaux nécessaires à la formation des cellules de l'axe crypto-villositaire.

Les voies Wnt et Notch permettent le maintien des cellules souches. La division des cellules souches permet l'apparition de cellules progénitrices qui migrent et se différencient le long de la villosité. *Hes1* permet la différenciation des cellules du lignage absorptif tandis que *Math1* permet la différenciation des cellules sécrétrices. L'appartenance des cellules Tuft au lignage sécrétoire reste un sujet de débat par la communauté. Elles expriment *Sox9* mais ce dernier n'est pas nécessaire à leur différenciation contrairement aux cellules de Paneth où il s'avère indispensable. *Spdef* est indispensable pour la formation de cellules de Goblet et de Paneth mais il agit plus en faveur des cellules de Goblet.

Deuxième partie: la voie des hormones thyroïdiennes et rôle dans la physiopathologie intestinale

I. La voie des hormones thyroïdiennes

A) Les hormones thyroïdiennes

1) Synthèse et régulation hormonale

Les hormones thyroïdiennes (HT) sont synthétisées par la glande thyroïde dans un processus finement régulé par l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde. (Ortiga-Carvalho et al., 2016). L'hypothalamus synthétise et secrète l'hormone thyrotrope (TRH de l'anglais thyrotropine-releasing-hormone) qui est transportée *via* les axones vers l'hypophyse. C'est à ce niveau que la TRH interagit avec son récepteur, et permet l'envoi d'un signal pour la synthèse de la thyrostimuline (TSH pour thyroid stimulating hormones). Cette hormone se fixe sur son récepteur localisé dans les cellules folliculaires de la thyroïde, ce qui permet la synthèse des hormones L-Thyroxine (T4, pro-hormone) et 3,5,3'-L- Triiodothyronine (T3, forme active) avec une production plus importante de la T4 (environ 40 fois plus) (Figure 9).

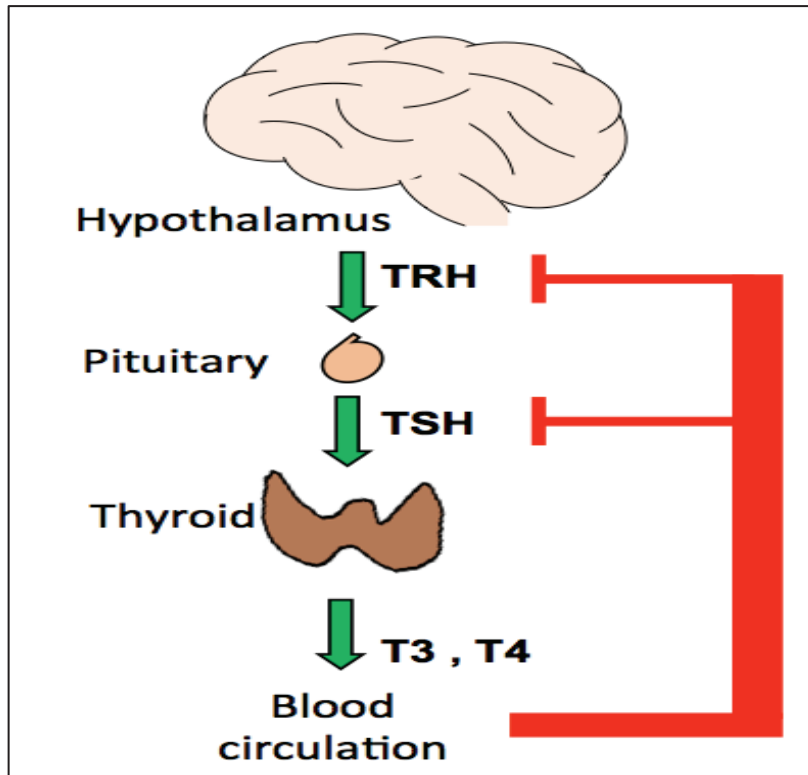


Figure 9 : Schématisation de la synthèse des hormones thyroïdiennes.

L'hypothalamus sécrète la TRH qui agit sur l'hypophyse en permettant la synthèse de la TSH. Cette dernière stimule la glande thyroïde qui à son tour sécrète les hormones thyroïdiennes, T3 et T4, qui accèdent ensuite à la circulation sanguine. Une boucle de rétrocontrôle négative existe puisque les HTs peuvent inhiber la sécrétion de la TRH et de la TSH par l'hypothalamus et l'hypophyse respectivement. (Skah et al., 2017).

Comme décrit précédemment, cette synthèse est soumise à une stricte régulation. En effet, des boucles de rétrocontrôle négatif sont présentes car les hormones thyroïdiennes régulent négativement la production de TSH et de TRH (Figure 9). De plus, un contrôle au niveau local subsiste puisque le taux d'hormones dépend aussi bien des transporteurs membranaires qui assurent leurs entrées dans les cellules, que de la présence d'enzymes permettant l'activation et/ou l'inactivation des hormones thyroïdiennes appelées deiodinases. (Bianco and Kim, 2006; Kinne et al., 2011; Ortiga-Carvalho et al., 2016).

2) *Transport des hormones thyroïdiennes*

Des transporteurs d'hormones thyroïdiennes situés au niveau de la membrane plasmique ont été décrits comme permettant l'entrée et l'action des hormones. Des données ont permis d'établir des transporteurs spécifiques pour la T3 comme pour la T4. (Pascual and Aranda, 2013) Parmi eux, le monocarboxylate 8 (MCT8) est celui qui est le mieux caractérisé (Kinne et al., 2011). En effet, il a été démontré que des mutations de MCT8 chez l'homme étaient responsables du syndrome de Allan-Herndon-Dudley (Friesema et al., 2004; Wirth et al., 2009). Ces patients présentent dans le sérum un niveau normal de TSH mais un taux élevé de T3, un taux diminué de T4, ainsi qu'un retard mental provoqué très probablement par une diminution d'absorption de T3 dans les neurones centraux exprimant normalement MCT8 (Dumitrescu et al., 2004; Friesema et al., 2004). Cependant, des souris KO pour MCT8 présentent seulement les effets endocriniens observés chez l'homme et non les effets neurologiques (Wirth et al., 2009). C'est à partir de ces observations qu'il a été suggéré l'existence d'autres transporteurs présents pour compenser l'absence de MCT8 : des transporteurs secondaires.

Les transporteurs primaires sont spécifiques des hormones thyroïdiennes tandis que les transporteurs secondaires peuvent en plus réguler le flux d'autres molécules comme les acides aminés. MCT10 est un autre membre de la famille des monocarboxylates et est le plus exprimé dans l'intestin (Gill et al., 2005). Il est catalogué comme un transporteur d'hormones

thyroïdiennes même s'il est à l'origine décrit comme un transporteur d'acides aminés aromatiques (Gill et al., 2005; Kim et al., 2001). Il est décrit que la transfection de cellules COS1 (cellules de tissu rénale de singe) avec un MCT10 humain favorise le transport intracellulaire de TH (Friesema et al., 2008), tandis que son inhibition diminue la quantité de TH intracellulaire et bloque les effets de la T3 antiprolifératifs observés dans des cellules ATDC5 (cellules chondrocytaires murines) et HEK293 (cellules embryonnaire de rein humaines) (Abe et al., 2012; Friesema et al., 2008). D'autres transporteurs sont également exprimés dans l'intestin. C'est le cas de OATP1A2, un transporteur d'anions organiques, et des transporteurs d'acides aminés neutres LAT1 et LAT2. Ces deux derniers font parti de la famille des protéines APC (Amino Acid-polyamine-Organocation) et forment des hétérodimères avec la protéine d'escorte 4F2hc (ou CD98) (Kinne et al., 2011) (Figure 10 A).

3) *Métabolisme des hormones thyroïdiennes*

Les sélénoenzymes iodothyronine déiodinases (DIOs) de type 1, 2 et 3 régulent le métabolisme des hormones thyroïdiennes en activant ou en inhibant la T4 et la T3 grâce à la soustraction d'un atome d'iode spécifique (Bianco and Kim, 2006; Ortiga-Carvalho et al., 2016). La DIO3 d'autre part, inactive la T3 et la T4 en les convertissant de manière respective aux formes métaboliquement inactives, T2 et reverse T3 (rT3), cette dernière en plus faible quantité (Bianco and Kim, 2006; Ortiga-Carvalho et al., 2016). L'inactivation de la DIO3 chez la souris (D3KO), conduit à une hyperthyroïdie générale pendant la période prénatale. Cette surexposition provoque une forte perturbation de l'axe hypothalamo-hyphyse-thyroïde (Hernandez et al., 2007). Dix jours après naissance, le taux d'HT est similaire à celui des souris WT, et à l'âge adulte les souris présentent une hypothyroïdie générale avec une diminution d'environ 50% du taux des HT probablement dû à la dérégulation de l'axe thyroïdien. De plus, les souris D3KO montrent de très faible indice de fertilité ainsi qu'un retard de croissance. Ce modèle murin d'établir le rôle que joue la DIO3 dans la régulation de l'axe thyroïdien. La DIO2 permet l'activation de la T4 en T3 à travers la déiodination, tandis que la DIO1 permet à la fois l'activation et l'inactivation de

la T4 de manière égale. (Ortiga-Carvalho et al., 2016). Cependant le rôle cette dernière n'est pas encore clairement établie. Des expériences menées sur des souris montrent que la déficience en DIO1 et/ou DIO2 ne conduit pas à un phénotype aussi sévère que celui des souris D3KO. Les souris D1KO et D2KO ne montrent ni de retard de croissance ni de problèmes de fertilité (Schneider et al., 2001, 2006). Cependant l'audition, la régulation de la TSH et de la thermogenèse sont perturbées chez les souris D2KO. Par ailleurs, le taux de TSH augmente significativement comparé aux souris WT et conduit à un taux de T4 très élevé tandis que le taux de T3 n'est pas affecté. (Schneider et al., 2001, 2006) (Figure 10 B). L'absence de DIO2 ne permet pas la conversion de T4 en T3 et a pour conséquence l'apparition d'un phénotype de résistance à la T4 de l'axe thyroïdien (Schneider et al., 2001). L'inactivation de la DIO1 a pour conséquence une augmentation du taux de la T4 mais contrairement au D2KO, les taux de TSH et de T3 restent inchangés et une augmentation du taux de rT3 est observée. Ceci est étonnant connaissant le rôle que joue la DIO1 dans la conversion de T4 en T3. Ces études montrent donc que la DIO1 possède un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la T3 (Schneider et al., 2006).

De manière intéressante, le KO simultané des enzymes DIO1 et DIO2 n'aggrave pas le phénotype observé chez les souris précédemment décrites (Galton et al., 2009). Seule une augmentation plus importante du taux de la T4, de la rT3 et de la TSH sont observées comparés aux simples mutants. Ces résultats montrent d'une part que les DIO1 et DIO2 ont des rôles indépendants de l'un et de l'autre dans le maintien du taux de TH, et d'autre part des mutations au niveau des gènes codant pour les déiodinases peuvent être à l'origine d'altérations du taux de HT chez l'homme (Hernandez et al., 2006).

Un autre rétrocontrôle subsiste à ce niveau puisqu'il a été démontré que la T3 régule l'expression des déiodinases. Pendant que la T3 régule positivement l'expression de DIO1, tel qu'il est observé chez les patients hyperthyroïdiens (Ito et al., 2011), l'expression de DIO2 et de DIO3 est régulée par l'hypo- et l'hyperthyroïdie respectivement (Wagner et al., 2007). Cependant les mécanismes moléculaires permettant une telle régulation n'ont pas encore été clairement montrés.

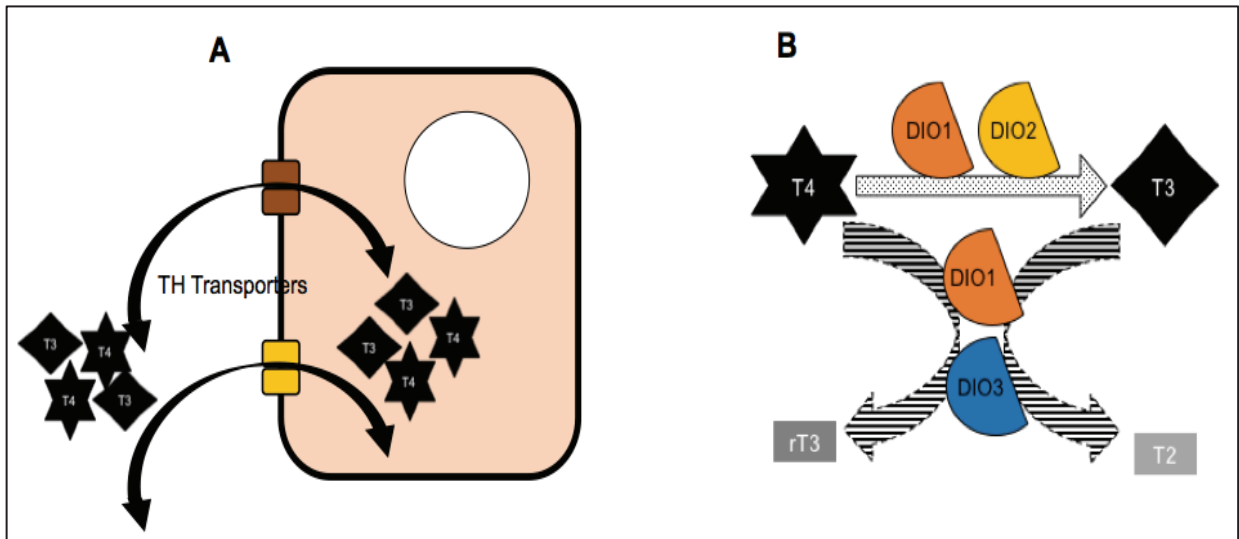


Figure 10 : A) Actions des transporteurs d'hormones thyroïdiennes.

Les transporteurs d'hormones thyroïdiennes sont localisés au niveau de la membrane plasmique et permettent la circulation des HT à travers les cellules **B) Action des déiodinases.** Les deiodinases 1 et 2 permettent la conversion de T4 en T3 tandis que les déiodinases 1 et 3 favorisent l'inactivation des HT en rT3 et T2. (Skah et al., 2017).

B) Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

1) Structures et isoformes

Une fois que les hormones thyroïdiennes traversent la membrane plasmique, elles agissent sur la cellule à travers leurs récepteurs. Etant donné que la T3 possède 40 fois plus d'affinité que la T4, elle est considérée comme le ligand naturel des récepteurs aux hormones thyroïdiennes. Ces derniers sont des facteurs de transcriptions appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones (NHR) (Laudet, 1997). Ils possèdent une organisation avec différents domaines similaires présents chez les NHRs. D'une part, ils présentent un domaine qui lie le ligand nommé LBD ou HBD (Ligand/hormone binding domain) et un domaine liant l'ADN appelé DBD (DNA-binding domain) (Figure 11 A). Ce dernier permet la fixation du récepteur à l'ADN sur des séquences spécifiques appelées TRE. D'autre part, ils conservent des domaines de fonctions activatrices (Activating function) AF-1 et AF-2, localisés du côté N-terminal et C-

terminal respectivement, et responsables des propriétés activatrices dépendantes ou indépendantes de l'hormone (González-Sancho et al., 2003). Chez l'homme, deux gènes codent pour ces récepteurs, *THRA* (chromosome 17) et *THRB* (chromosome 3) qui sont exprimés de manière très large dans différents organes et tissus. Des mécanismes d'épissage alternatif vont générer plusieurs isoformes qui se différencient par la taille des différents domaines et parmi lesquels TR β 1 et TR α 1 sont considérés comme les principaux isoformes. A partir du locus *THRB/Thrb* deux isoformes TR β 1 et TR β 2 sont produits chez l'homme et la souris, avec des domaines LBD et DBD ayant une forte homologie. Cependant TR β 2 possède un domaine C-terminal plus court (Oberste-Berghaus et al., 2000) (Figure 11 A).

Le locus *THRA/Thra* code pour 5 isoformes parmi lesquels seul TR α 1 possède les domaines fonctionnels lui attribuant le statut d'authentique NHR (Figure 11 A). Les isoformes TR α 2 et TR α 3 diffèrent par un domaine LBD plus court et incapable de lier l'hormone, mais leur domaine DBD reste intact créant ainsi une compétition pour les sites TRE. Ils sont donc considérés comme antagonistes de TR α 1 (Mitsubishi et al., 1988). Les deux autres isoformes TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 sont des protéines tronquées qui ne présentent ni de DBD, ni de LBD puisqu'ils sont transcrits grâce à un promoteur interne situé au niveau de l'intron 7 (Chassande et al., 1997). Des expériences menées sur les souris TR $\alpha^{0/0}$ (absence de tout isoforme TR α) et TR $\alpha^{-/-}$ (présentant uniquement les isoformes TR Δ) ont montré que TR α 1 et les isoformes TR Δ jouent des rôles opposés et se régulent négativement entre eux afin de maintenir l'homéostasie tissulaire de l'intestin (Plateroti et al., 2001).

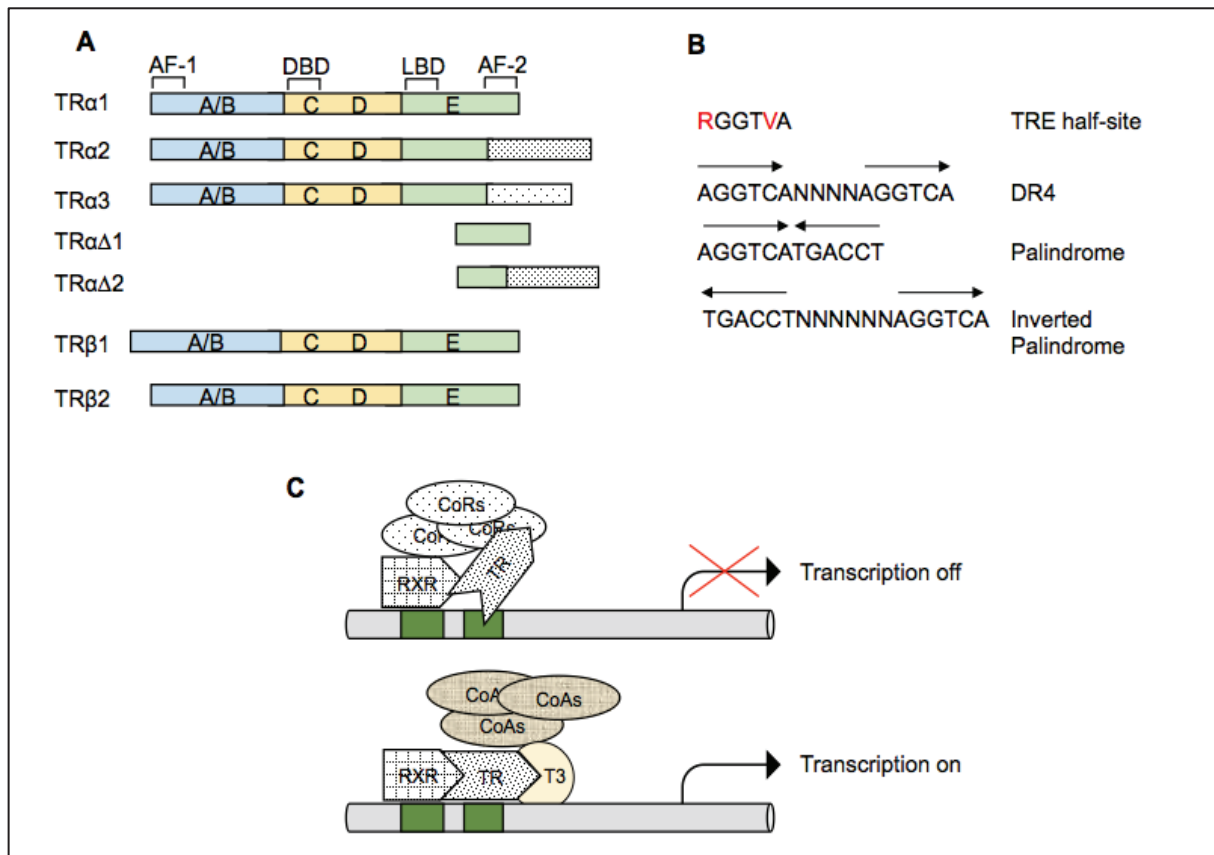


Figure 11 : A) Structures et isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes.

Le gène *THRB* code pour deux isoformes pendant que *THRA* code pour 5 isoformes parmi lesquels TRα1 est le seul possédant tous ses domaines fonctionnels. Des régions permettent la fixation de co-facteurs (localisées dans A/B, D et E) et la dimérisation (situées dans C et E) **B) Organisation des sites TRE (Thyroid Response Element)**. Les TRE sont des tandems de séquences de nucléotides organisés en DR4, palindrome ou palindrome inversé **C) Mécanismes d'action des TRs**. Les TRs se fixent sur les promoteurs de gènes cibles grâce au site TRE, et la présence de la T3 permet le recrutement de co-activateurs et la transcription résultante. (Skah et al., 2017).

2) Mécanismes d'actions

C'est à travers le domaine DBD que le récepteur à l'ADN se lie sur des séquences spécifiques présentes sur le promoteur de gènes cibles. Dans le cas des TRs ces séquences sont des éléments de réponse dites TRE (de l'anglais Thyroid Response Element). La séquence consensus du TRE est un tandem de 6 nucléotides répétés séparés par 4 nucléotides appelé Direct Repeat 4 (DR4) (Yen et al., 2006). Cette organisation peut différer de la séquence consensus. On retrouvera ainsi d'une part des palindromes et des palindromes inversés ; et d'autre part un nombre variable de

nucléotides séparant les séquences. Il est important de signaler que ce sont les DR4 qui sont le plus communément retrouvés, mais que plusieurs TRE peuvent être présents, sûrement dans le but d'améliorer l'interaction entre l'ADN et le récepteur aux HTs. (Williams et al., 1991) (Figure 11 B).

Après fixation sur l'ADN, les récepteurs aux HTs forment des hétérodimères avec les récepteurs de l'acide rétinoïque 9-cis (RXR), un autre membre de la superfamille des NHR. La transactivation des récepteurs est aussi régulée et assurée grâce à l'interaction avec d'autres complexes présents, des coactivateurs (CoAs) et des corépresseurs (CoRs). Dans le cas de gènes positivement régulés, après liaison de la T3 sur son récepteur, un changement de conformation va permettre la dissociation des CoRs et le recrutement de CoAs pour activer la transcription de gènes cibles (Wagner et al., 1995). Il existe cependant des gènes régulés négativement après liaison de la T3. C'est le cas des gènes codant pour la TSH et la TRH qui sont réprimés en présence de CoAs et induits en présence de CoRs, montrant à nouveau l'importance du rétrocontrôle dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien (Eckey et al., 2003) (Figure 11 C).

C) Actions non génomiques de la voie des hormones thyroïdiennes

Il a été montré que les HT/TRs pouvaient agir par d'autres mécanismes, indépendamment de la liaison au TRE (Davis et al., 2016). Les mécanismes les plus étudiés sont décrits par la suite (figure 12).

Les premières études ont montré une action des HT sur la mitochondrie et le cytosquelette. Tandis que la T3 favorise la respiration mitochondriale dans le foie chez le rat (Sterling et al., 1980), la T4 permet la polymérisation de l'actine facilitant ainsi le remodelage du cytosquelette dans des cellules astrocytaires (Siegrist-Kaiser et al., 1990). D'autre part, des travaux ont permis d'établir que les HT favorisent l'activation de la pompe calcium ATPase après interaction au

niveau de la membrane de cellules érythrocytaire, cellules caractérisées par l'absence de noyau (Davis et al., 1989).

Une étude a montré dans des fibroblastes humains, qu'après liaison de T3 sur TR β au niveau du cytoplasme, TR β peut activer la voie PI3K en interagissant avec P85, une sous-unité de PI3K (Cao et al., 2005). Cette interaction conduit donc à la transcription de gènes cibles tels que HIF-1 α . HIF-1 est un facteur de transcription dont les gènes cibles jouent des rôles importants dans le métabolisme de carbohydrate, l'angiogenèse, l'adaptation à l'hypoxie, la croissance et l'invasion tumorale (Semenza, 2010).

Les travaux menés par le groupe de Davis ont montré que la T4 et T3 pouvaient se lier à l'intégrine $\alpha\beta3$ (Bergh et al., 2005) (Figure 12). Cette interaction a été initialement décrite dans une lignée de cellules de rein de singe (CV-1) n'exprimant aucune forme de TR. Cette protéine membranaire possède en effet, deux sites de liaisons pour les TH nommés S1 et S2, pouvant lier spécifiquement la T3 et la T4 respectivement. Le site S2 peut aussi lier la T3 mais avec une plus faible affinité. Le site S1 induit l'activation de la voie PI3K, tandis que S2 active la voie ERK1/2 (MAPK)(Lin et al., 2009). L'activation de cette voie induit l'expression du facteur de croissance de fibroblaste 2 (FGF2) et favorise l'angiogenèse (Davis et al., 2004).

La croissance et le renouvellement du tissu osseux requièrent l'action en combinaison des ostéoclastes et ostéoblastes. L'activation de Erk, Akt, et Src par l'oxyde nitrique (NO) permet la stimulation des ostéoclastes et ostéoblastes (Rangaswami et al., 2009, 2010, 2012). De plus, une étude a montré que les HT pouvaient stimuler la cascade signalétique du NO afin de favoriser la prolifération et formation de l'os (Kalyanaraman et al., 2014). Etonnement, cette action des HT nécessite la présence d'un nouvel isoforme de TR $\alpha1$ produit à l'aide d'un promoteur interne (p30 TR $\alpha1$) (Kalyanaraman et al., 2014). Cette protéine de 30 KD est situé au niveau de la membrane des ostéoblastes, et permet la production de NO après action des HT. L'action non génomique des HT permet donc de contrôler la formation et le maintien de l'os (Kalyanaraman et al., 2014).

L'action non génomique des HT a donc lieu principalement au niveau de la membrane plasmique, et contribue à la structure et à la prolifération cellulaire.

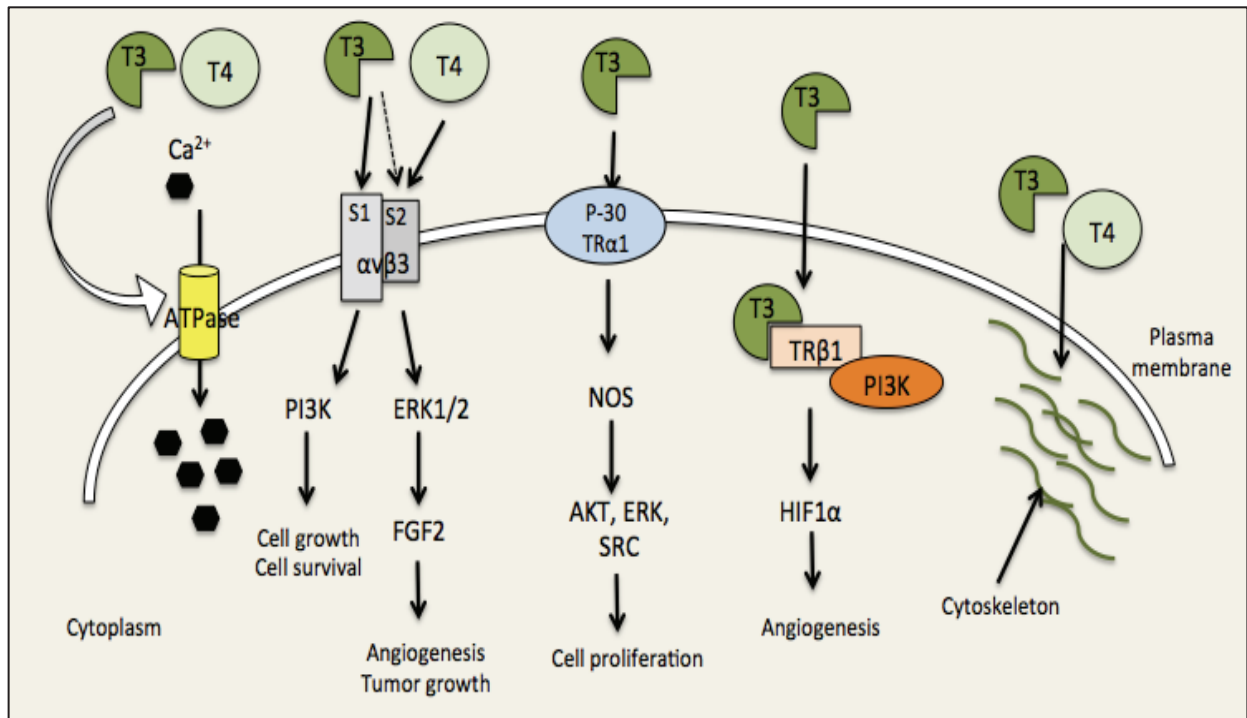


Figure 12 : Actions non génomiques des hormones thyroïdiennes. Les HT sont capables de stimuler la pompe de calcium ATPase au niveau de la membrane plasmique. D'autre part, elles permettent l'activation de voies tels que PI3K et ERK à travers l'association avec l'intégrine $\alpha\beta3$, p-30TR α 1 et TR β 1. Une action sur le renouvellement du cytosquelette par les HT a également été montrée.

II. Rôle des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans la physiopathologie

A) TR β

Le syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes (RTH) lié au récepteur TR β est caractérisé par une absence totale ou partielle d'actions des HT dans les tissus et se manifeste par une hyperthyroïdie générale (Weiss and Refetoff, 2000). Bien que les symptômes varient entre patients, on retrouve généralement une petite taille, une perte de poids, de la tachycardie, une dyslexie, des déficits d'attention associés à une hyperactivité, un goitre, et un QI diminué (Weiss and Refetoff, 2000; Yen, 2003). Des mutations hétérozygotes au niveau du gène *THRB* sont responsables de ce syndrome et une seule mutation homozygote a été décrite, avec un phénotype et un syndrome très complexe et sévère (Ono et al., 1991).

Afin d'étudier l'implication des TR dans le syndrome RTH, différents modèles murins présentant des mutations au niveau des TR ont été établis grâce à des approches de Knockin. Je décrirai donc par la suite les différents modèles Knockin établis. Des modèles murins présentant des mutations pour *Thrb* grâce à des approches de knockin, ont permis d'étudier en détail l'implication de TR β dans le syndrome de RTH. Les souris (TR β PV) par exemple présentaient les mêmes signes cliniques que ceux montrés chez les patients (Griffith et al., 2002; Hashimoto et al., 2001; Kamiya et al., 2003; Kaneshige et al., 2000; O'Shea et al., 2003; Siesser et al., 2005) ainsi qu'une forte dérégulation de l'axe hypophyse-thyroïde. De manière intrigante, il a été observé qu'au sein d'un même patient des tissus montraient des signes d'hyperthyroïdie pendant que d'autres présentaient une hypothyroïdie locale (Weiss and Refetoff, 2000; Yen, 2003). Etant donné que les isoformes de TR présentent des expressions différentes dans les tissus de l'organisme, ces données montrent que pour des fonctions dépendantes de TR β , les symptômes sont spécifiques de l'hypothyroïdie alors que pour les fonctions dépendantes de TR α , les symptômes sont ceux de l'hyperthyroïdie étant donné les niveaux élevés de T3 et T4. Il faut rappeler que les TR sont exprimés différemment selon les tissus. TR α 1 est exprimé de

manière ubiquitaire mais son expression est plus importante dans le tractus gastro-intestinal, l'os, les muscles cardiaques et squelettiques, et le système nerveux central (Lazar, 1993). D'autre part, tandis que TR β 1 est présent dans le foie et dans le rein, TR β 2 est exprimé dans l'hypothalamus, l'hypophyse, la rétine (Lazar, 1993). Par ailleurs, les animaux issus du croisement des souris mutantes knockin pour TR β PV avec des souris déficientes en TR α 1 (TR α 1^{-/-}), présentaient un syndrome RTHB plus aggravé (Suzuki and Cheng, 2003). Ces modèles montrent que TR α 1 peut jouer un rôle important dans le maintien de l'action des HT chez des patients atteints de RTHB.

B) TR α

Etonnement, aucune mutation au niveau du gène *THRA* n'avait été décrite chez des patients jusqu'à 2012. Le premier patient atteint de RTHA dû à une mutation sur *THRA* était une fille de 6 ans (Bochukova et al., 2012). Elle présentait un retard de croissance avec un faible indice de masse corporel. A l'âge de 7 mois (après le sevrage) elle avait des problèmes de constipation et de péristaltisme au niveau de l'intestin, ainsi que d'autres problèmes d'ordre neurologiques. Ces symptômes sont en accord avec le profil d'expression de TR α 1 dans les différents tissus. Les analyses par séquençage ont dévoilé une mutation par substitution en position 1207 (G->T). Cette mutation appelée E403X, conduit à l'apparition d'une protéine tronquée sans l'hélice α (H12) du côté C-terminal. La perte de l'hélice 12 empêche la liaison avec l'hormone ainsi que le recrutement de coactivateurs. Ce mutant empêche donc la transcription de gènes cibles, en restant lié aux corépresseurs. Il agit comme un inhibiteur par compétition de manière dominante négative (Bochukova et al., 2012).

Depuis, au moins 25 patients ont été déclarés. Ils présentent des taux de T3 normaux ou élevés, différents niveaux de retard mental, des retards de croissance, et des constipations (Bochukova et al., 2012; van Gucht et al., 2016; Moran and Chatterjee, 2015; Moran et al., 2013, 2014, van Mullem et al., 2012, 2013; Schoenmakers et al., 2013). Plusieurs mutations ont été repérées. Les

trois mutations décrites les plus récentes sont: une délétion de 4 nucléotides au niveau de l'exon 9 qui provoque un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (codon 387) ; une deuxième mutation (1151G>A) conduit à la substitution de l'acide aminé Arg par une His au niveau du codon 384 ; une troisième mutation (G787T) provoque le remplacement d'une Alanine par une Serine au niveau du codon 263 (Demir et al., 2016). Des analyses fonctionnelles ont révélé par la suite, que les différentes protéines mutées agissaient tous comme des dominants négatifs (Demir et al., 2016).

Afin de comprendre les mécanismes d'action de TR α *in vivo*, des modèles murins mutants par des approches des knockin dans le gène *Thra* ont été générés. De manière intéressante, les différentes mutations conduisaient à des phénotypes différents de ceux retrouvés chez les souris TR β PV (Liu et al., 2003; Tinnikov et al., 2002). De plus, chaque mutant présentait des phénotypes différents l'un de l'autre. La même mutation PV a été insérée dans le gène *Thra* et a pour conséquence la perte de toute capacité à lier la T3 et donc la perte de sa capacité transactivatrice. Elle provoque un nanisme, mais pas de dérégulation au niveau de l'axe hypophyse-thyroïde (Kaneshige et al., 2001). Une deuxième mutation TR α 1R384C diminue la capacité à lier la T3 mais son activité transactivatrice est restaurée après traitement avec des doses très élevées de T3. Les souris présentent une réduction de la masse grasseuse corporelle, et un retard de croissance réversible après traitement aux THs (Tinnikov et al., 2002). Un troisième mutant généré (TR α 1P398H) présente une augmentation de la masse grasseuse corporelle, et l'analyse du sérum montre une augmentation du taux d'insuline, de glucose, et de leptine (Liu et al., 2003)

L'ensemble de ces données suggère que le phénotype peut varier selon la localisation de la mutation dans le gène. Par ailleurs, ces trois mutations sont situées au niveau de l'hélice 12, qui normalement subit une réorganisation structurelle majeur après liaison à la T3 (Wagner et al., 1995), montrant que des mutations sur cette hélice compromettent l'action de TR α 1.

III. Rôle de la voie des hormones thyroïdiennes dans le développement de l'intestin

A) Rôles des hormones thyroïdiennes

L'implication des hormones thyroïdiennes dans le développement de l'intestin a été clairement démontrée chez les amphibiens pendant la métamorphose (Furlow and Neff, 2006; Shi et al., 2001; Su et al., 1999). En effet, il a été décrit que pendant la métamorphose, l'intestin subit un remodelage total avec une restructuration plus complexe qui est accompagnée d'une apoptose massive, suivi d'une prolifération cellulaire accrue (Ishizuya-Oka and Shi, 2005). Chez les mammifères, des travaux ont pu décrire une action des HT sur l'intestin. Bien qu'un changement post-natal persiste chez les mammifères, il n'est pas aussi drastique que chez les amphibiens. Pendant la période de sevrage, une restructuration affecte l'épithélium intestinal avec l'apparition d'enzymes digestives caractéristiques de l'état l'adulte, ainsi qu'un développement structural de la muqueuse typique de l'animal adulte accompagné d'une augmentation de la prolifération cellulaire. (Henning, S D. Rubin and S. Shulman, 1994). Chez les rongeurs, le niveau d'HT augmente significativement pendant la période du sevrage (Hadj-Sahraoui et al., 2000) indiquant que ces changements surviennent parallèlement à l'augmentation des HT (Henning, S D. Rubin and S. Shulman, 1994).

B) Rôles des récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Il a été montré chez les amphibiens que l'expression de TR β augmente avec le taux d'HT pendant la métamorphose, confirmant une action des HT à travers TR β (Ishizuya-Oka and Shi, 2005; Tata, 2006). Cependant une action importante de TR α 1 a également été montrée, car l'inactivation de ce gène perturbe la métamorphose (Wen et al., 2017). Chez les mammifères, des modèles murins ont permis d'établir le rôle de TR α 1 dans l'action des HT sur le remodelage de

l'épithélium digestif pendant le sevrage. En effet, tandis que des souris $TR\beta^{-/-}$ (absence d'isoformes $TR\beta$) ne présentent pas de changements morphologiques ou fonctionnels au niveau de l'intestin (Plateroti et al., 1999), les souris $TR\alpha^{-/-}$ (absence d'expression de $TR\alpha1$ et $TR\alpha2$ mais présence des isoformes $TR\Delta\alpha$) présentent un retard de croissance avec une altération du développement osseux, une hypoplasie, une hypotrophie ainsi qu'un intestin morphologiquement très atteint (Fraichard et al., 1997). Les souris deviennent hypothyroïdiennes pendant le sevrage et meurent dès la quatrième semaine après la naissance montrant que le gène *Thra* est essentiel à la survie de l'animal et au développement post-natal (Fraichard et al., 1997). Les souris $TR\alpha^{0/0}$ qui ne présentent aucun transcrite généré à partir du locus *Thra*, présentent une altération du phénotype moins sévère que les $TR\alpha^{-/-}$, très probablement due à l'absence des isoformes $TR\Delta$ (Gauthier et al., 2001). De plus, les souris $TR\alpha^{0/0}$ présentent une diminution du nombre de cellules prolifératives des cryptes. Des expériences d'induction d'hyperthyroïdie et hypothyroïdie sur ces souris ont montré que c'est à travers $TR\alpha1$ que les HT agissent pendant le sevrage (Plateroti et al., 2001). Inversement, la surexpression de $TR\alpha1$ spécifiquement dans l'épithélium intestinal grâce à l'utilisation du promoteur de la Villine (souris *vil-TR\alpha1*), conduit à une augmentation de la prolifération cellulaire, à l'apparition de cryptes ectopiques, à l'élargissement des cryptes et à la formation de villosités plus petites (Kress et al., 2010). Ces résultats confirment le rôle primordial que joue $TR\alpha1$ dans la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal.

Etant donné l'implication de $TR\alpha1$ dans l'intestin, je me focaliserai sur cette isoforme pour la suite de ma thèse.

IV. Coopération entre TR α 1 et voies de signalisation

Chez les amphibiens, il a été clairement démontré que l'axe TH/TR pouvait agir sur les voies BMP et SHH (Ishizuya-Oka and Hasebe, 2008). Cependant chez les mammifères, bien que les voies BMP et SHH soient impliquées dans le contrôle de l'homéostasie intestinale, aucune étude ne montre une possible régulation par TR α 1. Seul les ligands BMP2 et BMP4 sont décrits comme régulés par les HTs (Kress et al., 2009). Cependant, les études menées par l'équipe ont montré une coopération entre TR α 1 et les voies Wnt et Notch. Ces travaux sont décrits par la suite.

A) Coopération entre TR α 1 et la voie Wnt

Comme mentionné précédemment, l'équipe a montré que c'est à travers TR α 1 que les HT jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération des progéniteurs de l'épithélium intestinal chez les mammifères. De plus, TR α 1 est retrouvé exprimé dans un gradient croissant le long de l'axe crypto-villositaire et de manière très importante au niveau du compartiment de prolifération, à l'inverse de TR β 1 qui est présent dans les villosités (*rev in* Sirakov et al., 2014). Etant donné la forte implication de la voie Wnt dans le maintien du compartiment prolifératif de l'épithélium intestinal, l'équipe a cherché parmi la voie Wnt des mécanismes décrivant l'action de l'axe HT/TR α 1 dans l'intestin. L'équipe a montré que l'hyperthyroïdie chez la souris induisait dans l'intestin l'expression de la β -caténine tandis que l'hypothyroïdie diminuait son niveau d'expression (Plateroti et al., 2006). De plus, des expériences d'hyperthyroïdie et hypothyroïdie induites chez les souris TR β ^{-/-} et TR α ^{0/0} ont montré que cette régulation dépendait du récepteur TR α 1 (Plateroti et al., 2006). En outre, l'équipe a pu montrer par des expériences de précipitation de la chromatine, la régulation direct du gène *Ctnnb1*, codant pour la β -caténine, par TR α 1 grâce à la présence d'un TRE situé dans l'intron 1 (Plateroti et al., 2006). Des expériences de microdissection laser ont été réalisées afin d'isoler les cryptes intestinales de souris WT avec un statut thyroïdien normal ou perturbé (hyperthyroïdie ou hypothyroïdie), et

de souris KO pour TR α et TR β . L'équipe a ensuite réalisé des expériences de microarray afin de définir des gènes cibles de l'axe HT/TRs. Les microarrays ont permis de décrire *Sfrp2*, comme un gène cible des HTs, et la découverte d'un site TRE sur son promoteur a confirmé une régulation transcriptionnelle par TR α 1 (Kress et al., 2009). De plus, l'équipe a montré que sFRP2 favorisait la stabilisation de la β -caténine et la prolifération cellulaire des progéniteurs de l'épithélium intestinal *in vitro*, mettant en évidence dans l'épithélium intestinal un rôle inducteur de la voie Wnt de la part de sFRP2 (Kress et al., 2009; Skah et al., 2015). TR α 1 est donc capable de réguler positivement la voie Wnt à deux niveaux différents (figure 13).

La surexpression de TR α 1 dans l'épithélium intestinal à l'aide du promoteur de la Villine (souris *vil-TR α 1*) conduit à l'apparition d'adénomes et à une augmentation du niveau de la β -caténine nucléaire et de gènes cibles de la voie Wnt impliqués dans la prolifération cellulaire tels que *c-Myc*, *Cyclin D1*, *c-Fos* et *c-Jun* comparé aux souris WT (Kress et al., 2010).

Enfin, et de manière très intéressante, lorsque TR α 1 est surexprimé dans l'épithélium intestinal chez des souris portant des mutations au niveau du gène *Apc* (et donc une voie Wnt activée), des adénocarcinomes se forment plus rapidement comparé au simple mutant *Apc* (Kress et al., 2010) montrant qu'une coopération entre TR α 1 et la voie Wnt peut subsister afin de favoriser la prolifération cellulaire et la tumorigénèse.

B) Coopération entre TR α 1 et la voie Notch

Des études précédentes dans l'équipe ont montré que les HT pouvaient réguler l'expression de gènes de la voie Notch (Kress et al., 2009). Afin de comprendre les mécanismes de cette régulation, des expériences ont été menées avec les modèles murins KO pour TR α ^{0/0} et le modèle rapporteur de Notch *Hes1-EmGFP^{SAT}* (Sirakov et al., 2015). L'injection d'HT sur des souris *Hes1-EmGFP* et WT, induit l'augmentation d'expression de l'ARNm de Notch1, *Hes1* et des ligands *Jag1*, *Dll1* et *Dll4* comparé aux souris non traitées. Cependant, le traitement sur des souris TR α ^{0/0} n'a aucun effet, indiquant que l'activation de Notch par les TH dépend de TR α 1. Des recherches

in silico ont permis de décrire des sites TRE putatif présents uniquement sur le promoteur de *Jag1* ; et par des approches d'immunoprécipitation de chromatine, l'équipe a confirmé la fixation de TR α 1 sur *Jag1*. De manière intéressante, l'ajout d'un anticorps anti-Jag1 sur des cultures primaires d'épithélium intestinal murins traitées à la T3, bloque l'augmentation de l'activité Notch observée auparavant. Cela indique que Jag1 participe à l'activation de Notch dans l'épithélium intestinal. (Sirakov et al., 2015).

TR α 1 active donc directement la transcription de *Jag1* et est indirectement responsable de l'augmentation de l'expression de *Notch1*, *Dll1* et *Dll4* (Figure 13) et des gènes cibles tels que *Hes1* (Sirakov et al., 2015).

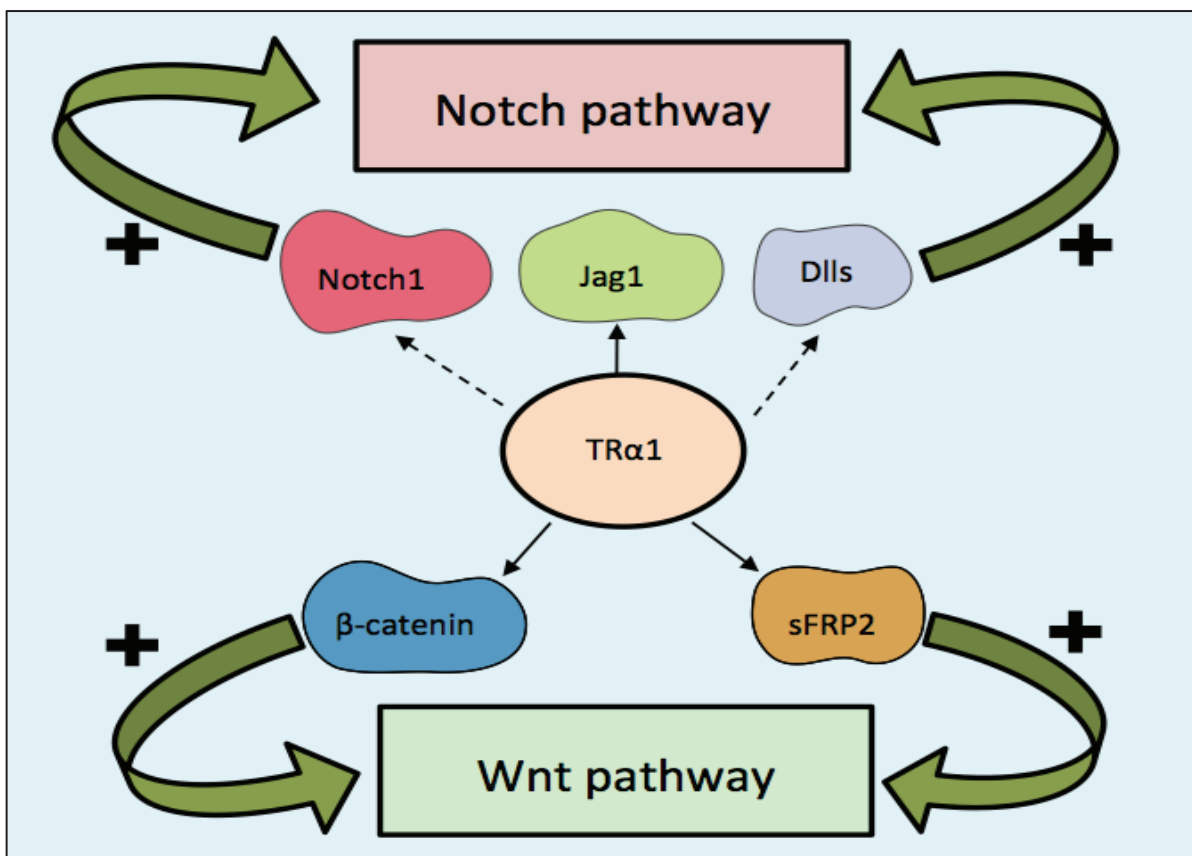


Figure 13 : Action de TR α 1 sur les voies Wnt et Notch.

TR α 1 favorise l'activation de la voie Wnt en stabilisant la β -caténine et régule positivement l'expression de sFRP2, un activateur de cette voie. De la même manière, TR α 1 régule positivement l'expression de *Notch1* et *Dlls* et stabilise Jag1 après interaction. Ainsi, TR α 1 favorise la voie Notch. Les flèches en continues montrent une régulation directe tandis que les flèches en pointillées montrent une régulation indirecte.

Troisième partie : cancer colorectal, initiation et progression

I. Cancers colorectaux

A) Description

Selon l'Agence International de Recherche contre le Cancer (IARC), le cancer colorectal (CRC) est le troisième cancer le plus répandu dans le monde chez l'homme après le cancer de la prostate et du poumon, et le deuxième chez la femme après le cancer du sein. Les pays développés sont les plus touchés avec environ 55% des cas dans le monde. 44000 nouveaux cas sont détectés en France par an, et le cancer colorectal reste la deuxième cause de décès par cancer avec 17500 décès annuel.

1) Facteurs de risque et dépistage

Divers facteurs de risque ont été identifiés. Des facteurs internes tels que l'âge (95% des cancers colorectaux se déclarent après 50 ans), et la prédisposition génétique donnent naissance aux cancers héréditaires (Basso et al., 2017). Ces cancers représentent moins de 5% de l'ensemble des CRC et surviennent avant les 40 ans. Il existe aussi des facteurs externes parmi lesquels sont décrit le surpoids, l'inactivité physique, l'alimentation, et la consommation d'alcool et tabac (Øines et al., 2017). Ces facteurs sont à l'origine des CRC dits sporadiques qui représentent 95% des cancers.

Au cours des années, les méthodes de dépistages ont évolué, permettant d'améliorer l'efficacité de détection. Les tests actuels sont catalogués comme non-invasifs et invasifs (Issa and Nouredine, 2017). Nous retrouvons parmi les tests non invasifs, **les analyses de selles** qui cherchent à détecter du sang ou des débris cellulaire dus à la présence de polypes, d'adénomes ou de cancers vascularisés ; **les analyses de sang** permettant également d'identifier des débris cellulaire ou des gènes mutés et/ou méthylés par de simples réactions en chaîne de polymérase (PCR), comme c'est le cas pour la Septine 9 qui a été associé aux CRCs (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011); et enfin les **tests radiologiques** qui cherchent à visualiser

et identifier des polypes ou cancer dans l'organisme. La coloscopie et la sigmoïdoscopie sont les méthodes invasives permettant la visualisation directe et détection de polypes ou cancer dans une zone spécifique (Issa and Noureddine, 2017).

2) Classification tumorale

La majorité des CRC se développe à partir de cellules situées sur la paroi interne du colon après cancérisation de lésions ou polypes adénomateux (tumeur bénigne) (Jass, 2007). Selon la Ligue Contre le Cancer (LNCC), dans 40 à 60% des cas, des cellules cancéreuses corrélées à la tumeur primaire traversent la barrière épithéliale et entrent dans les vaisseaux sanguins pour migrer et peupler d'autres organes formant ainsi des métastases. L'organe principalement touché par les métastases est le foie. Malheureusement dans 15 à 20 % des nouveaux cas déclarés, des métastases sont aussi détectées. A ce stade, la survie médiane des patients atteint les 6 mois que le patient soit traité ou non.

Afin de décrire un cancer selon l'étendue de la maladie dans l'organisme, un système de classification a été établi. Dans le cas du CRC, la classification TNM est la plus communément utilisée (Lewis, 2017). La lettre T classée de 1 à 4, décrit le grade d'invasion de la tumeur primitive dans le colon ou rectum; la lettre N indique le nombre de ganglions lymphatiques atteints par le cancer ; et la lettre M indique la présence de métastases dans d'autres organes. Cette classification permet de classer le CRC en stades tumoraux (de 1 à 4) selon la gravité de la maladie. Plus tôt le cancer est détecté et plus les chances de survie des patients après traitement augmentent.

B) Traitements contre le cancer colorectal

Le traitement du cancer colorectal est unique pour chaque cas puisqu'il dépend des caractéristiques tumorales et du patient (âge, état physique et psychique général, etc.). Les

différents traitements existant à nos jours sont décrits par la suite (sources : Ligue Contre le Cancer ; Fondation ARC).

La chirurgie constitue le traitement de base du cancer colorectal. L'intervention a pour but d'enlever la zone ou le tissu cancéreux présent dans l'organe, ainsi qu'une marge de tissu sain de 5cm autour de la tumeur afin de retirer des éventuelles cellules cancéreuses délocalisées. Une portion de l'intestin peut être également retirée ainsi que les ganglions lymphatiques voisins qui peuvent contenir des cellules cancéreuses ayant été éventuellement disséminées. Les organes atteints par les métastases peuvent également être opérés. Cependant la chirurgie est dans la plupart des cas associée à d'autres types de traitement comme moyen de prévention et ainsi détruire spécifiquement les cellules cancéreuses.

La chimiothérapie est souvent prescrite suite à une intervention chirurgicale afin d'améliorer l'efficacité du traitement. De nos jours les produits habituellement utilisés sont le 5-Fluorouracil (5 FU), la capécitabine (ou Xeloda), l'oxaliplatine (ou Eloxatine), l'irinotécan (ou Camptosar) et le raltitrexed (ou Tomudex). Ils peuvent être utilisés seuls ou en association, et ont pour but d'atteindre et de détruire les cellules cancéreuses pour éviter leur dissémination à travers la circulation sanguine. Si le cancer ne réagit pas aux médicaments, d'autres traitements ciblés peuvent être proposés seuls ou en association.

La thérapie ciblée. De nos jours une nouvelle classe de médicaments a été développée. Il s'agit d'anticorps monoclonaux dont le principal but est de bloquer un mécanisme spécifique de développement ou de prolifération tumorale avec des effets secondaires réduits. Ces molécules agissent sur l'angiogenèse inhibant des facteurs de croissances tels que VEGF (vascular endothelial growth factor) qui favorisent la croissance de vaisseaux sanguins avoisinant la tumeur (Carmeliet and Jain, 2011). Elles agissent également en ciblant des facteurs tels que EGF (epidermal growth factor) qui favorisent la division et la prolifération des cellules (Herbst, 2004). Les molécules les plus communément utilisées sont le Bévacicumad (ou Avastin), le Cétuximab (ou Erbitux), le Panitumumab (ou Vectibix), et les deux récemment commercialisés le

Regorafénib (ou Sivarga), et l'Aflibercept (ou Zaltrap). Le mécanisme d'action des différentes molécules ainsi que leurs cibles sont décrits dans le tableau n°1.

Molécules	Cibles	Action
Bévacizumab	VEGF	Limite la formation de nouveaux vaisseaux avoisinant la tumeur et limite donc l'apport en oxygène vers la tumeur
Regorafénib		
Aflibercept		
Cétuximab	EGF	Bloque la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses. Ce traitement est plus efficace sur des tumeurs ne portant pas de mutation <i>RAS</i>
Panitumumab	EGF	Inhibe la prolifération cellulaire. Son traitement est plus efficace en association à la chimiothérapie

Tableau n°1. Mécanismes d'action des anticorps utilisés dans la thérapie ciblée.

La radiothérapie est le recours à des doses de rayons ou particules capable de tuer les cellules cancéreuses, et peut être associée à d'autres traitements.

Malheureusement, il existe des cas où le cancer résiste aux différents traitements administrés et de nombreuses études visent d'une part à comprendre ces mécanismes de résistance et d'autre part, à chercher des traitements alternatifs visant d'autres mécanismes que ceux déjà ciblés.

II. Initiation et progression tumorale

A) Adenomatous polyposis (APC) : la protéine suppresseur de tumeur

Le cancer colorectal est la cancérisation d'un adénome ou tumeur bénigne à travers l'altération de plusieurs gènes tels que des gènes tumeurs-suppresseur ou des oncogènes (Yamagishi et al., 2016). Il existe une forme héréditaire de CRC qui est la polypose adénomateuse familiale (PAF) (de l'anglais FAP pour Familial Adenomatous polyposis), une maladie autosomale dominante

héréditaire (Kinzler and Vogelstein, 1996). Les patients développent des centaines voire des milliers de polypes tout le long de l'intestin et la cancérisation de ces adénomes conduit à l'apparition des CRC. Des mutations du gène *APC* ont été trouvées et décrites comme causes principales des PAF. Tandis que la mutation mono allélique permet le développement de polypes chez les patients atteints de PAF, la mutation du deuxième allèle sauvage induit l'apparition d'un phénotype aggravé ainsi que le développement de quelques tumeurs. Ce processus est décrit comme « two hits », décrivant ainsi les deux mutations sur chaque allèles (Knudson, 1993; Zhang and Shay, 2017). Par ailleurs, des mutations somatiques sur ce même gène ont aussi été découvertes dans la grande majorité de CRC sporadiques (80%) (Miyoshi et al., 1992; Powell et al., 1992), montrant un rôle suppresseur très important dans le contrôle de la tumorigenèse *via* le contrôle de la voie Wnt/ β -caténine.

L'implication de l'altération génétique d'*Apc* dans la tumorigenèse a été confirmée *in vivo* chez la souris. Des animaux présentant des mutations au niveau du gène *Apc*, développent des tumeurs mais contrairement à l'homme, celles-ci se développent majoritairement dans l'intestin grêle (McCart et al., 2008; Zeineldin and Neufeld, 2013). De manière intéressante, les modèles murins existants montrent qu'un degré de sévérité phénotypique existe selon le site de la mutation du gène *Apc* (tableau °2). En effet des mutations peuvent toucher un ou plusieurs sites d'interactions avec les protéines membres du complexe de destruction de la β -caténine auquel participe la protéine APC (Zeineldin and Neufeld, 2013)(Figure n°14).

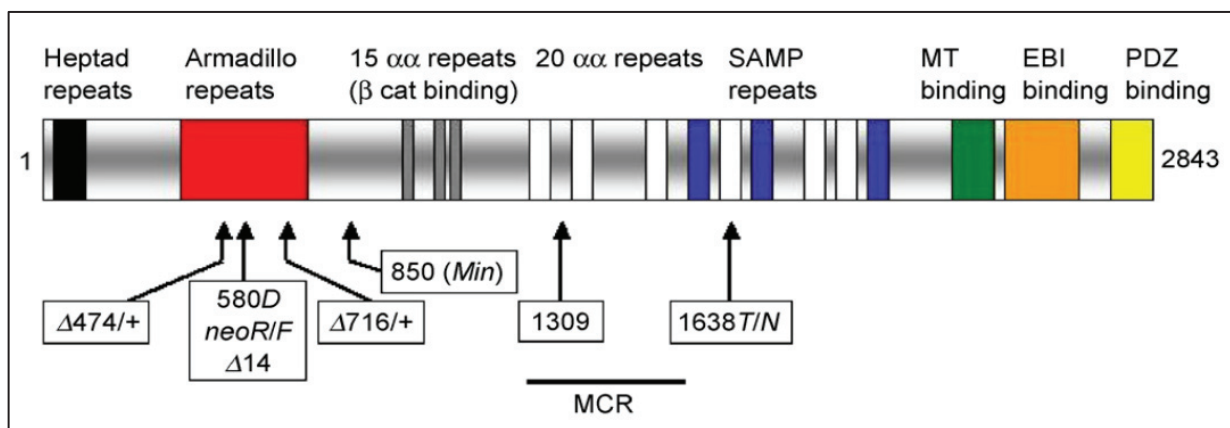


Figure 14. Schématisation des mutations touchant le gène *Apc* chez la souris. D'après McCart et al., 2008.

Lignée murine	Mutation	nombre de polypes	Histologie	Références
<i>Apc</i> ^{Min/+}	Mutation non-sens sur le codon 850	≈30 -->100	Présence d'adénomes et cystes au niveau des cryptes. Modèle classique des PAF	(Moser et al., 1990)
<i>Apc</i> ^{Δ716/+}	Cassette néomycine insérée dans l'exon 15 formant une protéine tronquée au codon 716	≈300	présence d'adénomes mais épithélium villositaire normal	(Boivin et al., 2003; Oshima et al., 1995)
<i>Apc</i> ^{1638N/+}	Insertion en orientation antisens de cassette néomycine au niveau de l'exon 15. Protéine tronquée au niveau du codon 1638	< 10	Adénocarcinomes très différenciés infiltrant la muqueuse et sous-muqueuse	(Fodde et al., 1994)
<i>Apc</i> ^{1039/+}	Décalage du cadre de lecture au niveau du codon 1309	≈35	Présence de polypes tout au long de l'intestin et nombre plus important de polypes dans le colon comparé aux <i>Apc</i> ^{Min/+}	(Quesada et al., 1998)
<i>Apc</i> ^{Δ14}	Décalage du cadre de lecture au niveau du codon 580	≈65	Augmentation du nombre de polypes au niveau du colon. Adénomes et carcinomes invasives après 12 mois	(Colnot et al., 2004)

Tableau n°2. Résumé des différentes mutations *Apc* générées chez la souris.

B) Mécanismes impliqués dans la progression tumorale

Grâce à des modèles murins de carcinogenèse induite génétiquement ou par des agents chimiques, plusieurs études ont pu confirmer *in vivo*, que la perte de fonction du gène d'*Apc* était un évènement précoce et requis pour l'initiation tumorale (Fearon and Vogelstein, 1990; Kinzler and Vogelstein, 1996; Nandan and Yang, 2010). Par ailleurs, d'autres études ont montré que le niveau de Wnt pouvait varier pendant la progression tumorale afin de favoriser le développement de la tumeur. Un modèle dit « three-hit » a ainsi été proposé, dans lequel le niveau de Wnt pouvait être modulé par exemple grâce à la mutation d'un troisième allèle apparu après un défaut de recombinaison mitotique comme observé dans des lignées de CRC (Segditsas et al., 2009). Un autre modèle dit « just-right » suggère qu'un degré optimal de la β-caténine

nucléaire est nécessaire puisque la délétion de tous les sites d'interaction de la β -caténine (et donc l'activation constitutive de la voie Wnt) peut entraîner beaucoup d'instabilité et même la mort cellulaire (Albuquerque et al., 2002). Ces régulations sont décrites comme des mécanismes d'adaptation aux multiples changements qui peuvent apparaître dans le microenvironnement ou suite à l'acquisition d'altérations génétiques additionnelles.

Par ailleurs, bien que l'inactivation d'*Apc* est un évènement précoce dans l'initiation tumorale, il a été montré que la progression tumorale dépendait de l'apparition d'autres altérations génétiques dans la séquence adénome-adénocarcinome (Fearon and Vogelstein, 1990) (Figure 15). Des mutations au niveau de *K-ras*, de *Smad* et de *TP53* ont été décrites comme contribuant à cette progression tumorale et entraînent d'autres altérations tels que des modifications épigénétiques (Fearon, 2011; Zamani et al., 2016).

Ras est une famille de petites protéines G qui ont pour fonction d'assurer la signalisation des récepteurs de facteurs de croissance (Malumbres and Barbacid, 2003). Trois de ces membres (KRAS, HRAS, NRAS) sont souvent cibles de mutations somatiques dans plusieurs cancers chez l'homme (Malumbres and Barbacid, 2003). KRAS en particulier est retrouvé muté dans 40% des CRCs et la mutation la plus décrite est celle affectant le codon 12. Des mutations KRAS contribuent à la progression tumorale mais ne sont en aucun cas nécessaire pour l'initiation tumorale. Par ailleurs des études montrent que l'inactivation de l'allèle mutant KRAS dans des cellules issues de CRC, inhibent la croissance tumorale *in vitro* et le développement de tumeurs à partir de xénogreffes sur des souris nude (Shirasawa et al., 1993). En effet, il n'est pas surprenant que KRAS soit cible de mutations somatiques puisqu'il joue un rôle important dans l'activation de voies impliquées dans la tumorigenèse telles que MAPK, PI3K et PTEN (Fearon, 2011; Rajagopalan et al., 2002).

TP53 est un régulateur transcriptionnel clé de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et dans l'angiogenèse (Green and Kroemer, 2009). Il permet d'induire la mort cellulaire dans des conditions de stress tels que l'hypoxie, des cassures au niveau de l'ADN

ou la diminution d'apport de nutriments. Il est muté dans la plupart des CRC ayant subi une perte d'hétérozygotie au niveau du chromosome 17. Les cellules tumorales mutées pour TP53 acquièrent des nouvelles caractéristiques leur permettant de survivre aux conditions de stress. Pendant la séquence adénome-adénocarcinome, les cellules obtiennent donc des propriétés invasives, anti-apoptotiques et prolifératives (Fearon, 2011).

Une perte d'hétérozygotie est aussi observée au niveau du chromosome 18 dans 70% des CRCs. **SMAD2** et **SMAD4** sont dans la plupart des cas mutés à cause de cette perte d'hétérozygotie. Ils codent pour des protéines assurant le signal des récepteurs aux facteurs de croissance TGF- β . Des mutations au niveau de **SMAD4** sont détectées dans 10-15% des CRCS tandis que des mutations **SMAD2** sont trouvées dans environ 5% des tumeurs (Leary et al., 2008; Wood et al., 2007).

Deux études ont réussi à récapituler cette séquence mutationnelle *ex vivo* dans des modèles de cultures primaires (Drost et al., 2015; Matano et al., 2015). Grâce à l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 pour éditer le génome, chaque mutation (APC, KRAS, TP53 et SMAD4) a été introduite dans des organoïdes d'intestin humain. De manière intéressante les organoïdes quadruple-mutants formaient des tumeurs solides et pouvaient se développer *in vitro* même en absence de facteurs nécessaires à la niche souche intestinale. De plus, l'injection sous-cutanée en souris nude des organoïdes quadruple-mutants conduisait à l'apparition de tumeur avec des propriétés invasives tandis que l'injection d'organoïdes triple-mutants (KRAS, PAC, TP53), ne formait que des adénomes avec peu de cellules prolifératives. Ces études ont montré par ailleurs, que la double mutation APC/TP53 était suffisante à l'acquisition d'une forte instabilité chromosomique et d'une aneuploïdie (Drost et al., 2015). L'acquisition des quatre mutations est donc nécessaire à l'acquisition de propriété invasive *in vivo* et *in vitro*.

L'ensemble des études montre l'importance de chaque événement de cette séquence adénome-adénocarcinome dans la progression tumorale.

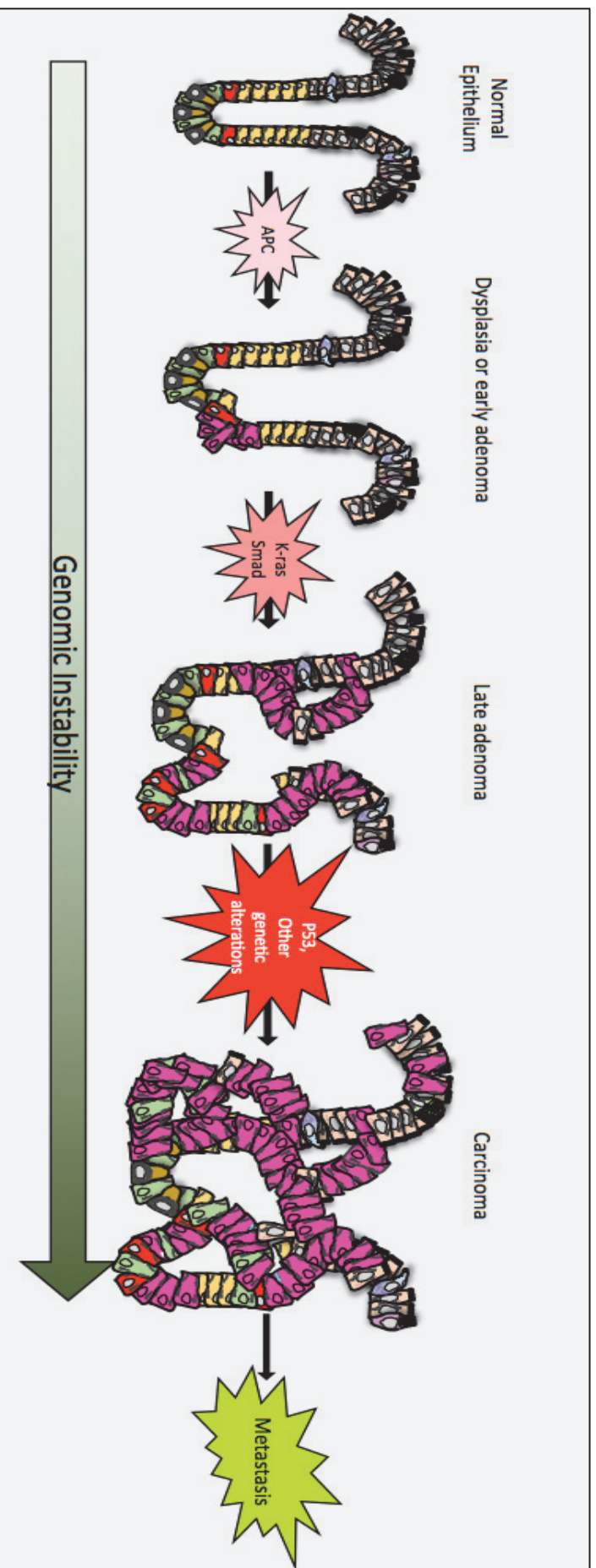


Figure 15 : Séquence adénome-adénocarcinome.

L'inactivation d'*Apc* est le premier événement primordial pour la séquence adénome-adénocarcinome. Par la suite, l'évolution des carcinomes s'accompagne d'évènements tels que des mutations au niveau de *K-ras*, de *Smad*, de *TP53* ainsi que d'une grande instabilité génomique entraînant l'apparition de métastases.

C) Origine des cancers colorectaux

1) *Les cellules souches*

Le renouvellement de la majorité des tissus épithéliaux dépend de la présence de cellules souches (Simons and Clevers, 2011). La longue durée de vie et leur capacité à s'auto-renouveler, les rend cibles parfaites pour accumuler des mutations et donc favoriser la transformation des cellules (Visvader, 2011). Dans le cas de l'intestin, ces cellules résident au fond des cryptes de Lieberkhün, et au cours des années, plusieurs études ont visé à étudier le rôle de ces cellules souches dans l'initiation tumorale. A l'aide du modèle murin de KO conditionnel Lgr5-EGFP-IRES-creERT²/Apc^{flox/flox}, l'équipe du Professeur Clevers a montré que la perte du gène *Apc* spécifiquement dans les cellules souches conduisait à la formation d'adénomes et adénocarcinomes à partir des cellules des cryptes (Barker et al., 2009). Des tumeurs ont également été observées dans le colon. En outre, la population de cellules souches caractérisée par le marqueur Bmi-1 (Sangiorgi and Capecchi, 2008), a aussi été montrée comme capable d'initier la transformation tumorale (Barker et al., 2009) L'ensemble de ces résultats indique que la transformation des cellules souches est un prérequis pour l'initiation tumorale.

2) *Les cellules souches cancéreuses*

Au cours des dernières années et sur la base de plusieurs études, la communauté scientifique a accepté la notion de cellule souche cancéreuse (CSC). Ce concept décrit un réservoir de cellules autonomes capable de s'auto-renouveler, d'initier et de maintenir une tumeur (Clarke et al., 2006; Medema, 2013). Ces cellules seraient à l'origine de la résistance contre les différents traitements et seraient aussi plus susceptibles de métastaser. Les études actuelles visent donc à trouver des mécanismes permettant de cibler spécifiquement ces cellules (Medema, 2017). De plus, des marqueurs permettant d'isoler les CSCs ont été établis, mettant ainsi en évidence leur existence au sein de la tumeur. C'est le cas de CD133 (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al.,

2007) CD44 et EpCAM (Dalerba et al., 2007) qui ont été aussi décrits dans le cas du cancer de colon.

Deux études ont tenté de cibler les CSCs issus de tumeurs murines en induisant la mort spécifiquement des cellules LGR5+ (Shimokawa et al., 2017; de Sousa e Melo et al., 2017). Les équipes ont ainsi observé une régression limitée et temporelle de la tumeur. De nouvelles CSCs LGR5+ semblaient apparaître et la tumeur se reformerait. Le travail de Shimokawa a montré que la dédifférenciation de cellules tumorales différenciées était responsable des cellules souches cancéreuses nouvellement formées (Shimokawa et al., 2017). Celles-ci repeuplèrent la tumeur après la mort des CSC. Ces observations sont en accord avec la plasticité décrite au sein des cellules des cryptes intestinales (Yousefi et al., 2017). Ce même groupe a mis en évidence que l'ablation des CSCs accompagné du traitement avec le Cetuximab était plus efficace contre la régression de la tumeur que le traitement seul. Ces données ouvrent des portes à de nouvelles stratégies afin de cibler les CSC et lutter contre les cancers.

3) Les cellules différenciées

Comme le suggère les données précédentes, des cellules différenciées peuvent être responsables du maintien de la tumeur et plusieurs études ont confirmé cette hypothèse. Une augmentation de l'activité Wnt dans des cellules différenciées tels que les entérocytes, permet la formation d'adénomes à partir de ces cellules et la réexpression de gènes associés à la signature souche de l'intestin (Schwitalla et al., 2013). De plus la surexpression de Gremlin1 chez la souris conduit à l'apparition de cryptes ectopiques au niveau de la villosité, capables d'initier la tumorigenèse (Davis et al., 2015). En 2014, une équipe a montré que dans des conditions inflammatoires appropriées, la délétion du gène *Apc* dans des cellules Tuft chez la souris, conduit à la formation de tumeurs dans le colon (Westphalen et al., 2014).

L'ensemble de ces études décrit diverses origines possibles du cancer et donc les différences phénotypiques et moléculaires que nous pouvons rencontrer au sein des tumeurs colorectales. Ces différences sont définies par l'hétérogénéité tumorale.

D) L'hétérogénéité tumorale

L'hétérogénéité inter-tumorale représente les différences biologiques et moléculaires que nous trouvons dans des tumeurs de mêmes origines chez des patients différents (Gerashchenko et al., 2013). Cette hétérogénéité peut être due à l'ordre dans lequel apparaissent les différents événements de la séquence adénome-adénocarcinome ainsi qu'aux différents facteurs de risques externes auxquels chaque personne est soumise. Cela a pour conséquence la nécessité d'adapter les traitements pour chaque patient selon les caractéristiques des tumeurs. Dans le cas du cancer du sein, cette hétérogénéité a bien été décrite (Wolman and Heppner, 1992) et une analyse transcriptomique faite à large échelle a permis de décrire 5 sous-groupes différents de cancer du sein selon leurs caractéristiques moléculaires, chaque sous-groupe différant également par leurs sensibilités au traitement (Adamo and Anders, 2011; Perou et al., 2000).

Une dernière notion à décrire est celle d'hétérogénéité intra-tumorale. Elle est définie comme la coexistence de différentes populations de cellules cancéreuses avec des parcours évolutifs différents au sein d'une même tumeur. Cette hétérogénéité favoriserait la tumeur puisqu'elle permettrait de créer un réservoir de cellules chimiorésistantes (Gerlinger et al., 2012) et a été montré comme marqueur de pronostic défavorable dans le cas du cancer du sein (Park et al., 2010). Dans une première hypothèse, les CSCs seraient à l'origine de cette hétérogénéité. Ces cellules acquièrent une prolifération accrue et une capacité de division asymétrique pouvant générer différentes CSCs et des sous-clones de tumeurs (Denison and Bae, 2012; Michor and Polyak, 2010; Russnes et al., 2011). Dans un deuxième modèle dit d'« évolution clonale », le cancer se développerait à partir d'une cellule, et pendant la progression tumorale l'instabilité génomique favoriserait une pression de sélection pour des clones plus agressifs (Nowell, 1976)

(Figure 16). Des facteurs environnementaux extrinsèques peuvent aussi être à l'origine de l'hétérogénéité tumorale. Une étude a montré que dans des glioblastomes vascularisés, l'oxyde nitrique produit par les cellules endothéliales, favorisait l'activation de la voie Notch et donc maintien du statut souche des cellules tumorales proches des vaisseaux sanguin (Charles et al., 2010). D'autre part, il est possible qu'il y est une combinaison de différents facteurs, et que des cellules souches cancéreuses soient cibles à la fois de facteurs intrinsèques (changements génétiques) et de facteurs intrinsèques (Magee et al., 2012) (Figure 16).

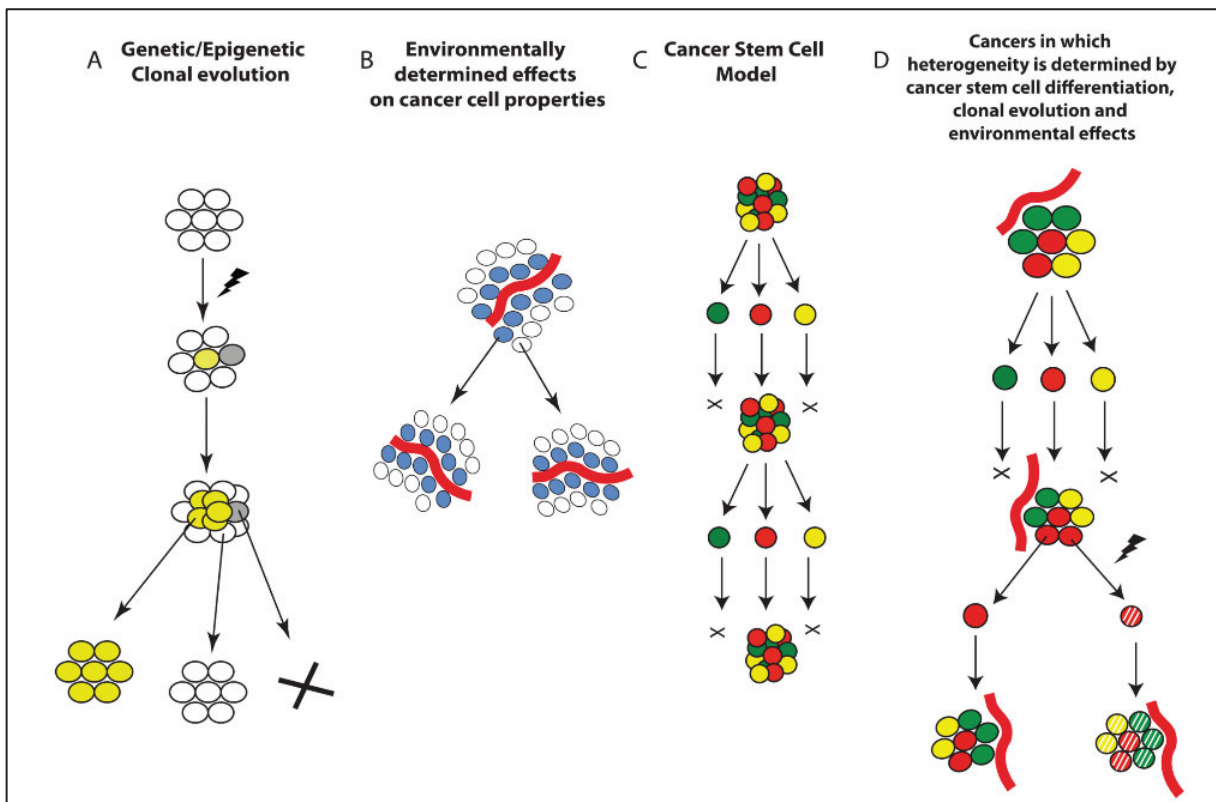


Figure 16. Origines de l'hétérogénéité tumorale. A) Le modèle d'évolution clonale indique que la division de la cellule cancéreuse, crée des sous-clones de la cellule originale (cellules jaune, blanche et grise). L'instabilité génétique provoque une pression de sélection, auquel seules les clones les mieux adaptés survivent (cellules jaune et blanche). Les tumeurs formées sont donc plus agressives. **B) Facteurs externes à l'origine de l'hétérogénéité.** Comme il l'a été montré dans le modèle de glioblastome, les vaisseaux sanguins favorisent l'activation de Notch et donc maintien de l'état souche des cellules à proximité (cellules en bleu). **C) Les cellules souches cancéreuses** se divisent et chacune est à l'origine d'une sous population de tumeur avec des caractéristiques génétiques différentes. **D) Origines multiples de cancer.** Des facteurs à la fois intrinsèques et extrinsèques peuvent être à l'origine des cancers. D'après (Magee et al., 2012)

Ces différentes données montrent le rôle majeur que peuvent avoir les CSCs et l'hétérogénéité tumorale dans les diverses réponses et résistances aux traitements anti-cancer. Afin de contrer cela, des études visent à regrouper des tumeurs selon des caractéristiques moléculaires afin de trouver des traitements plus adaptés.

III. Caractérisation moléculaire du cancer colorectal

Au cours des dernières années, beaucoup d'études ont cherché à caractériser d'un point de vue moléculaire les différents cancers du tractus gastro-intestinal (Bijlsma et al., 2017). Dans le cas du cancer colorectal, différentes classifications ont été établies mais elles divergent sur les types et nombre de sous-groupes. C'est probablement dû aux différentes méthodes d'analyses d'expression de gènes, de génération de données et d'algorithmes utilisés (Rodriguez-Salas et al., 2017). Les différentes études faites afin de caractériser des sous-groupes de CRC sont décrites par la suite.

A) Classification de sous-types de cancer de colon (CCS) (De Sousa E Melo et al., 2013)

Pour cette analyse 90 tumeurs de stade II ont été analysées et les résultats ont été validés sur 1100 patients. Trois sous-groupes ont été identifiés nommés CCS1, CCS2 et CCS3.

CCS1. Le premier regroupe 49% des tumeurs, et comprend les tumeurs présentant des mutations *KRAS* et *TP53*, une forte instabilité chromosomique (CIN) et une importante activité de la voie Wnt/ β -caténine.

CCS2. Ce deuxième sous-type représente les tumeurs avec une forte instabilité micro-satellitaire (MSI) et méthylation des ilots CpG (CIMP). Il regroupe 24% des tumeurs.

CCS3. Dans ce sous-groupe se trouvent les tumeurs qui peuvent présenter une CIN et MSI mais sont caractérisées par une surexpression de gènes associés à l'EMT, au remodelage de la matrice

extracellulaire et à la migration cellulaire. On trouve aussi des mutations de BRAF et PI3CA, et une voie TGF- β activée. Dans ce sous-groupe sont caractérisés les tumeurs agressives, et résistantes au traitement au Cetuximab, classant les tumeurs CCS3 comme de mauvais pronostic.

B) Classification CRCA (Colorectal cancer assigner) (Sadanandam et al., 2013)

Le profil d'expression génique de 1290 tumeurs a été étudié et a permis de décrire 5 sous-groupes. Chaque sous-groupe présentait des profils d'expression semblable à ceux des différents sous-types cellulaires de l'épithélium intestinal. Ils ont donc été nommés selon cette caractéristique.

Groupe « souche ». Se distinguant par une surexpression de gènes appartenant à la voie Wnt, ce groupe montre aussi des caractères souches myoépithéliaux et mésenchymateux, ainsi qu'une faible expression de marqueurs de différenciation. Les tumeurs de ce groupe sont de mauvais pronostic et associées à un faible taux de survie.

Groupe « goblet ». Ce groupe est caractérisé par l'augmentation de marqueurs spécifiques des cellules de Goblet tels que MUC2 et TFF3.

Groupe « amplification transitoire ». Nommé ainsi d'après les cellules progénitrices, ce groupe montre une expression très variée de gènes associés aux cellules souches et à la voie Wnt. Ce sous-type a été divisé en deux selon leur sensibilité au traitement au Cetuximab. Le sous-groupe résistant est caractérisé par la surexpression de la Filamine A, une protéine régulant l'expression et le signal des récepteurs cMET. Les tumeurs du sous-type sensible ainsi que ceux du groupe goblet, sont de bon pronostic.

Groupe « inflammatoire ». Comme indiqué, ce groupe est caractérisé par une augmentation du nombre de gènes reliés aux interférons et aux cytokines.

Groupe « entérocyte ». Les tumeurs de ce groupe présentent une forte expression de gènes associés aux cellules entérocytaires.

C) Sous-types moléculaires de cancer de colon (CCMS) (Marisa et al., 2013)

C'est à partir de 750 tumeurs de tous stades confondus que cette analyse d'expression d'ARNm à large échelle a caractérisé 6 sous-groupes différents (Figure 17).

C1. Ce groupe est caractérisé par des mutations au niveau de *KRAS* et *TP53*, par une *CIN* ainsi que par l'absence de voie de signalisation associée à l'activation du système immunitaire et à la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT). Elle regroupe 21% des tumeurs.

C2. Rassemblant 19% des tumeurs, ce groupe se distingue par une MSI, une CIMP et des mutations de *BRAF*. L'activation du système immunitaire et l'absence de toute activité Wnt caractérisent aussi ce groupe.

C3. Caractérisé par une stabilité micro-satellitaire (MSS) et des mutations *KRAS*, ce groupe comprend 13% des tumeurs. Aucune voie de signalisation associée à l'activation du système immunitaire et à l'EMT n'est décrite dans cette voie.

C4. Qualifié comme groupe souche, il présente une *CIN*, une CIMP et des mutations au niveau de *KRAS*, de *BRAF* et *TP53*. Il présente une surexpression de gènes associés à l'EMT et est défini comme un groupe de mauvais pronostic. Il est aussi associé à la rechute tumorale et regroupe 10% des tumeurs.

C5. Il regroupe 27% des tumeurs et est caractérisé par une forte *CIN*, des mutations *KRAS* et *TP53*, et une forte activité Wnt.

C6. Ce groupe se définit par une *CIN*, des mutations *KRAS* et *TP53*, et par l'expression de gènes liés à l'EMT. Ce sous-type est aussi caractéristique d'un mauvais pronostic.

De manière intéressante, l'activité Wnt est un critère pour la caractérisation des sous-groupes mais contrairement aux 2 autres classifications, la caractérisation de Marisa n'associe pas la voie Wnt à un mauvais pronostic.

		Serrated precursor neoplasia				Conventional precursor neoplasia	
		C2 (dMMR)	C4 (CSC)	C3 (KRASm)	C6 (CIN _{normL})	C5 (CIN _{WntUp})	C1 (CIN _{ImmuneDown})
Genome instability	dMMR	+++				0	
	CIMP	+++	++	+		0	
	CIN	+	++			+++	
Mutations	BRAF	++	+			0	
	KRAS		++	+++		++	
	TP53		+			++	
Signatures	SC-like	+	+++	0		+	0
	Normal-like		++	+	+++		+
	BRAFm-like	+++	++	+		0	
	Serrated CC-like	+++		++			-
Pathways	Immune Syst	↗	-	↘	-	-	↘
	Wnt pw	↘		-		↗	-
	Proliferation	↗	↘	-	↘	-	-
	EMT/Motility	-	↗	↘	↗	-	↘

Figure n°17. Caractéristiques moléculaires des six sous-groupes de la classification CCMS. La fréquence relative est indiquée par des symboles (0 : très faibles fréquences ; +/- : fréquences intermédiaires ; +++ : très fortes fréquences), et les flèches indiquent une régulation positive (en rouge) et une régulation négative (en vert) pour chaque voie de signalisation. D'après Marisa et al., 2013.

D) Classification CRCSC (Colorectal cancer subtyping consortium) (Guinney et al., 2015)

Une analyse à large échelle utilisant 4000 tumeurs principalement de stade II et III, a permis d'identifier 4 sous-groupes de tumeurs permettant de classer correctement 78% des échantillons. (Figure 18)

CMS1 est un groupe caractérisé par une MSI, une forte CIMP, des mutations *BRAF* et par une activation du système immunitaire. Ce groupe est de bon pronostic mais lors de rechute les tumeurs sont très agressives et le taux de survie est très faible. On retrouve 14% des tumeurs dans ce sous-type.

CMS2. Ce groupe est défini par une MSS, une CIN, mais aussi une forte activation de la voie Wnt. Des mutations *TP53* sont aussi détectées. 37% des tumeurs sont regroupées dans ce groupe.

Comme pour la classification précédente, ce groupe n'est pas caractérisé par un mauvais pronostic.

CMS3. 23% des tumeurs sont présents et sont caractérisés par une faible CIN mais une forte CIMP. Un niveau modéré d'activité Wnt ainsi qu'une surexpression de IGBP2 et des mutations de *KRAS* et de *PI3K* définissent aussi ce groupe.

CMS4. Les tumeurs de ce sous-type se distinguent par une CIN très hétérogène, et présentent des caractéristiques mésenchymateuses avec une activation de la voie TGF β . Des voies de signalisation associées à l'angiogenèse, au remodelage de la matrice extracellulaire et à l'inflammation caractérisant également ces tumeurs. Ce groupe est associé à un mauvais pronostic, à la rechute tumorale et à une faible survie.

De manière intéressante, des caractéristiques communes sont retrouvées entre les groupes des différentes classifications décrites. Le groupe CMS1 possède des caractéristiques communes avec le groupe CCS2 de et le groupe inflammatoire de *De Sousa E Melo et al., 2013*, incluant la présence de MSI, de CIMP, et l'activation du système immunitaire. Le groupe CMS2 peut être associé au groupe CCS1 et le groupe entérocyte et/ou à amplification transitoire de la classification de *Sadanandam et al., 2013*. Le groupe CMS4 partage des caractéristiques mésenchymateuses similaires avec les tumeurs définies comme CCS3 (Figure19)

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermethylation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGFβ activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Figure n°18. Caractéristiques biologiques et moléculaires des quatre sous-groupes de la classification CMS. D'après Guinney et al.,2015.

CRCS	CCS system	CRCA system	CCMS system
CMS1 MSI/ immune	CCS2	Inflammatory	C2
CMS2 Canonical	CCS1	Enterocyte	C1
CMS3 Metabolic		Transit-amplifying	C3
		Globet-like	C5
CMS4 Mesenchymal	CCS3	Stem-like	C4
			C6

Figure n°19. Schéma représentant les similitudes entre les sous-groupes décrits par les différentes classifications. D'après Rodriguez-Salas et al., 2017.

Pour résumer, les différentes études nous ont permis de comprendre d'avantage sur le développement du CRC. Il est évident aujourd'hui qu'une forte hétérogénéité existe au sein des tumeurs et les différentes classifications décrites en témoignent. Cela implique que les futurs traitements doivent prendre en compte des caractéristiques moléculaires de chaque tumeur pour ainsi améliorer le taux d'efficacité.

IV. Implication de la voie Wnt dans la progression tumorale

Comme déjà décrit, la voie Wnt est très importante dans l'initiation tumorale. Il a également été montré que des modifications de gènes clés de cette voie pendant la progression tumorale étaient suffisantes pour freiner ou accélérer celle-ci. En effet, des modifications épigénétiques telles que la méthylation dans les cancers, entraîne l'inhibition de plusieurs gènes dont des inhibiteurs de la voie Wnt (Irizarry et al., 2009; Patai et al., 2015; Silva et al., 2014) comme WIF1. Il s'agit d'un inhibiteur naturel de la voie Wnt qui est montré comme étant fortement méthylé dans plusieurs types de cancer (Patai et al., 2015; Taniguchi et al., 2005). Il a été observé dans différents modèles de cellules cancéreuses, que la déméthylation ou la réexpression de WIF1 permettait l'inhibition de la progression tumorale et du statut « souche » des cellules (Ramachandran et al., 2014; Wang et al., 2015; Xu et al., 2015). Cependant, l'expression de WIF1 est augmentée dans la muqueuse de colon de souris traitées à l'AOM/DSS (Azoxyméthane/Dextran sodium sulfate)(Suzuki et al., 2007) et au Benso{a/pyrene/DSS (Koyama et al., 2015), des modèles chimiques de carcinogenèse colorectale induite. Les auteurs de ces études décrivent donc un mécanisme de protection de la cellule pour combattre les différentes mutations induites après traitement. Mais de manière intéressante, des adénomes issus de souris $Apc^{Min+/-}$ présentent de la même manière une augmentation de l'expression de WIF1 (Cebrat et al., 2004). Une deuxième hypothèse est alors évoquée dans laquelle la surexpression de WIF1 aiderait les cellules tumorales à inhiber la prolifération des cellules non mutées (Cebrat et al., 2004; Koyama et al., 2015).

L'inhibition des ligands de la voie Wnt tels que WNT1 et WNT2 permet aussi de freiner la progression tumorale et même d'induire de l'apoptose dans des lignées de cancer de poumon et de CRC (Chang et al., 2015; Shi et al., 2007), et à l'inverse leurs expressions augmentent la prolifération et la migration cellulaire, et sont étroitement liées à la progression tumorale (Kim et al., 2016; Nishioka et al., 2013; Willert et al., 2003). Par ailleurs des études ont montré une association entre la voie Wnt et la résistance à la chimio-radiothérapie. Une équipe a irradié des cellules cancéreuses de poumons afin d'obtenir une population résistante ; et de manière intéressante, les gènes de la voie Wnt étaient les plus altérés dans cette population (Ahn et al., 2014). Des analyses d'expression de gènes sur des lignées de CRC résistantes à la chimio-radiothérapie ont montré une suractivation de la voie Wnt dans ces cellules (Spitzner et al., 2010). Une autre étude a montré que l'inhibition du facteur de transcription de la voie Wnt TCF7L2, favorise la sensibilisation des lignées de CRC à la chimio-radiothérapie (Emons et al., 2017).

La voie Wnt est donc étroitement impliquée dans la progression tumorale et dans la résistance au traitement. Elle est donc l'objet d'étude pour des futurs marqueurs tumoraux ainsi que pour des thérapies ciblées (Nusse and Clevers, 2017; Serafino et al., 2014).

Quatrième partie : la voie des hormones thyroïdiennes et cancer

I. Hormones thyroïdiennes et cancer

Plusieurs études ont tenté d'établir un lien entre les hormones thyroïdiennes et le développement tumoral, cependant à nos jours ceci n'est pas clairement établi. Il existe deux écoles, la première qui qualifie les hormones thyroïdiennes comme ayant un effet pro-tumoral, et la seconde qui au contraire les indique comme étant anti-tumorales.

A) Un effet pro-tumoral des hormones thyroïdiennes

En effet, des études chez l'homme ont pu montrer une corrélation entre le taux des HTs et le développement tumoral. C'est le cas pour des patients atteints de cancer de la prostate dont le taux de HT est élevé (Lehrer et al., 2001; Mondul et al., 2012) ou encore chez des personnes où le taux de HT corrèle avec à un risque plus élevé d'apparition de cancer du sein (Tosovic et al., 2010). Des études menées chez le rat ont montré d'une part que le traitement à la T4 sur des sujets thyroïdectomiés contribuait à la prolifération des cellules progénitrices des compartiments prolifératifs de l'intestin (Carriere, 1966), et d'autre part, que des rats soumis à un protocole d'induction tumorale chimique à l'aide de l'AOM, un agent chimique carcinogène, développaient plus de tumeurs au niveau du colon lorsqu'ils étaient traités à la T4 comparé au traitement à l'AOM seul (Iishi et al., 1992). La croissance tumorale après implantation de lignées mammaires cancéreuses est réduite chez des souris rendues hypothyroïdiennes grâce au traitement avec un antithyroïdien de synthèse, le Propylthiouracile (PTU) (Shoemaker et al., 1976). L'hypothyroïdie chez des rats inhibe la croissance métastatique d'hépatome et prolonge leur survie (Boursi et al., 2015; Brown et al., 2013; Mishkin et al., 1981). L'ensemble de ces données suggèrent un rôle prolifératif et pro-tumoral des hormones thyroïdiennes (Brown et al., 2013).

B) Un effet anti-tumoral des hormones thyroïdiennes

De manière opposée, des études ont pu montrer un rôle anti-tumoral des hormones thyroïdiennes. Une étude a montré que des femmes présentant une hypothyroïdie avaient plus de risques d'être atteintes de carcinomes hépatocellulaires (HCC) (Hassan et al., 2009). Dans le cas de cancer de colon (CRC), des patients hypothyroïdiens ayant utilisé la levothyroxine (un analogue synthétique de la T4) pendant plus de 5 ans, présentaient un risque moins élevé d'être atteints de CRC (Rennert et al., 2010). De plus, des patients atteints de la maladie de GRAVE, un cas d'hyperthyroïdie très commun, présentent un risque réduit de développement de CRC (Shu et al., 2010). Par ailleurs l'expression de la DIO3, enzyme capable d'inactiver les HTs, est associée à la prolifération cellulaire, et elle est retrouvée surexprimée dans des adénomes, des carcinomes du colon et dans des lignées dérivées de tumeurs tels que de cancer du sein (cellules MCF-7), de cancer colorectal (Cellules Caco2, SW280 et HCT116), de neuroblastomes (Cellules SH-SY5Y) (Ciavardelli et al., 2014), montrant un lien entre une hypothyroïdie locale due à l'inactivation des HT et la carcinogénèse.

II. Récepteurs aux hormones thyroïdiennes et cancer

A) TR β 1 et son implication dans la carcinogénèse

Il a été montré que la mutation ou l'altération d'expression des TRs pouvaient être liée à la tumorigénèse (Kim and Cheng, 2013; Sirakov and Plateroti, 2011). Contrairement à l'intestin, il a été montré que TR β 1 contrôle la prolifération des cellules dans le foie (Kowalik et al., 2010). De plus l'augmentation de son expression est fortement corrélée à l'invasion tumorale dans des lignées de cancer hépatique (HCC) (Lin et al., 1995). Dans le cas du colon, son expression est fortement diminuée dans des cancer et cela est dû à une hyperméthylation (Markowitz et al., 1989). Par ailleurs, TR β 1 est associé à un phénotype plus différencié et sa perte d'expression est associée à une transformation maligne des tumeurs de colon (Hörkkö et al., 2006; Markowitz et al., 1989).

B) TR α 1 et son implication dans la carcinogénèse

Il existe très peu de donnée chez l'homme reliant TR α 1 et la carcinogénèse. Des études ont décrits des mutations au niveau du gène *THRA* dans des cancers papillaire de la thyroïde, de foie et de rein (Kamiya et al., 2002; Lin et al., 1999; Puzianowska-Kuznicka et al., 2002) et les mutations décrites empêchent la liaison du récepteur avec son ligand et leur action transactivatrice. Cependant un lien direct entre ces mutations et la carcinogénèse n'a pas été établi. De manière intéressante, une autre étude a montré que son expression était associée à un mauvais pronostic dans des tumeurs de sein présentant une mutation au niveau du gène *BRCA1*, et à l'inverse l'expression de TR β 1 était associée à un pronostic favorable (Heublein et al., 2015). Néanmoins, il reste à définir si l'expression de TR α 1 favorise la tumorigénèse.

Notre équipe a pu montrer chez la souris un effet pro-tumoral de TR α 1. En effet, sa surexpression dans l'épithélium intestinal conduit à une hyper prolifération des cryptes et même à l'apparition d'adénomes dans l'intestin grêle et dans le colon (Kress et al., 2010). Par ailleurs, des gènes impliqués dans la voie Wnt sont surexprimés dans l'intestin de souris *vil-TR α 1* comparé aux souris WT, suggérant une coopération entre TR α 1 et la voie Wnt. Ceci n'est pas étonnant connaissant l'implication de TR α 1 dans la voie Wnt (Kress et al., 2009; Plateroti et al., 2006). Cependant, la surexpression de TR α 1 à elle seule n'est pas suffisante pour déclencher un processus tumoral mais un contexte génétique approprié pourrait contribuer au déclenchement du processus tumoral. C'est dans ce but que les souris *vil-TR α 1* ont été croisées avec des souris présentant une mutation au niveau du gène *Apc* (*Apc*^{1638N/+}).

Les souris *Apc*^{1638N/+} développent un faible nombre de polypes (<10) avec des adénocarcinomes moyennement et hautement différenciés (McCart et al., 2008). De manière intéressante, pendant que les souris *Apc*^{1638N/+} développent des adénocarcionmes à 9 mois; les souris *vil-TR α 1/Apc*^{1638N/+} développent des adénomes à 3 mois, et à 6 mois des adénocarcinomes et des micro-métastases au niveau du foie, montrant une accélération du processus de carcinogénèse

dû à la surexpression de TR α 1 (Kress et al., 2010). Un schéma récapitulatif est présenté dans la figure n° 20. De plus, les acteurs clés et cibles de la voie Wnt tels que la β -caténine, c-Myc et la CyclineD1 sont surexprimés dans les tissus normaux et cancéreux des souris *vil-TR α 1/Apc^{1638N/+}* comparés à ceux des souris *Apc^{1638N/+}* (Kress et al., 2010). Ces résultats montrent que TR α 1 peut induire et accélérer le processus de carcinogénèse en régulant positivement la voie Wnt.

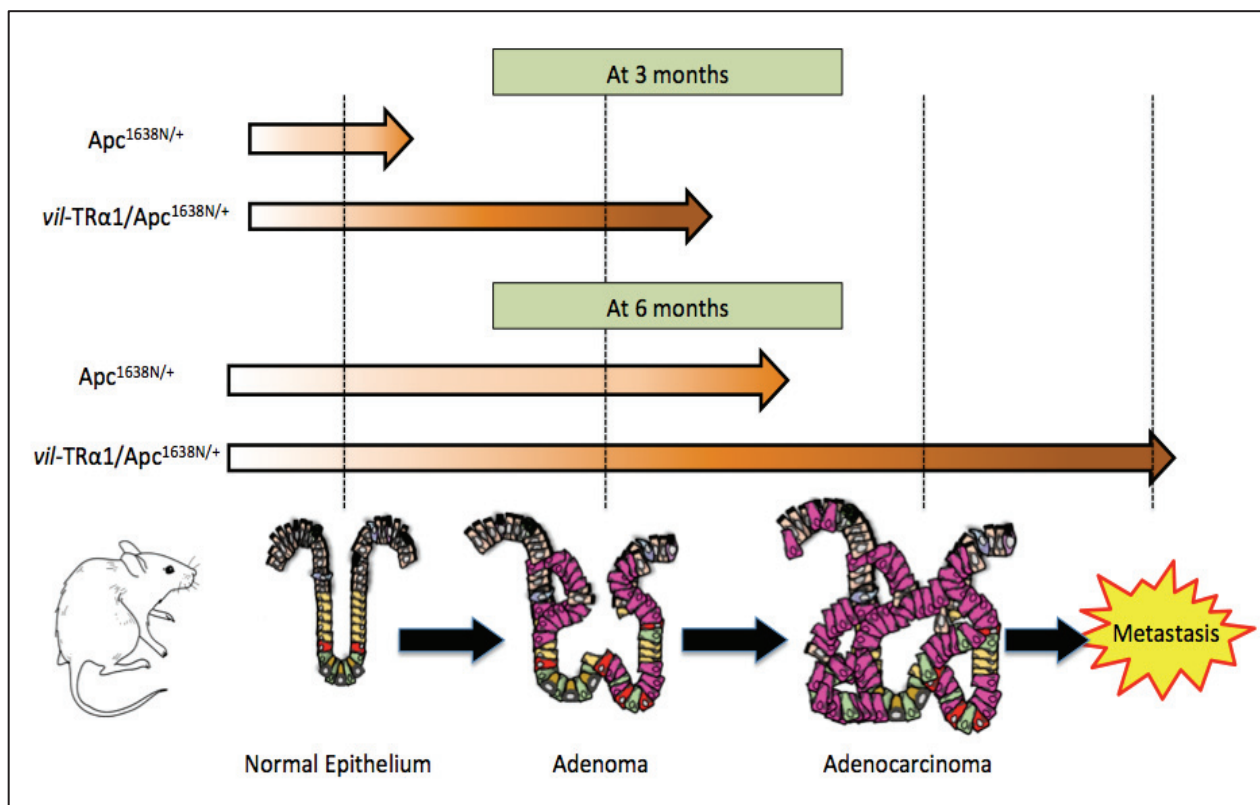


Figure 20 : Développement tumoral chez les souris *Apc^{1638N/+}* et *vil-TR α 1/Apc^{1638N/+}*.

Les souris *vil-TR α 1/Apc^{1638N/+}* présentent un développement tumoral accéléré par rapport aux souris *Apc^{1638N/+}*. Pendant que les souris *Apc^{1638N/+}* développent qu'à 6 mois des adénomes et quelques rares adénocarcinomes, les souris *vil-TR α 1/Apc^{1638N/+}* développent déjà des adénocarcinomes et quelques micro-métastases au niveau du foie.

Objectif des travaux de thèse

Les travaux de ma thèse ont pour but de définir les mécanismes par lesquels TR α 1 induit l'accélération de la carcinogenèse associée à la voie Wnt/ β -caténine. Pour répondre à cette question, une analyse transcriptomique par microarray a été réalisée sur des adénocarcinomes provenant de souris *vil*-TR α 1/*Apc*^{1638N/+} et de souris *Apc*^{1638N/+}. Cette analyse nous a permis de décrire un nombre important de gènes différentiellement régulés par la surexpression de TR α 1. Parmi eux, nous avons observé un nombre important de gènes appartenant à la voie Notch, la voie Wnt et des gènes décrits comme marqueurs de cellules souches. De plus, à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway, nous avons montré que la voie Wnt était fortement régulée dans les tumeurs de souris *vil*-TR α 1/*Apc*^{1638N/+}, attestant les études précédentes décrivant une coopération entre TR α 1 et la voie Wnt.

Afin de valider chez l'homme l'importance des données observées chez la souris, nous avons recherché une corrélation entre TR α 1 et la voie Wnt dans des tumeurs humaines de colon. Tout d'abord, nous avons observé dans des tumeurs humaines issues de deux cohortes indépendantes, l'augmentation de l'expression de TR α 1 en ARNm par RT-qPCR et en protéine par immunohistochimie. Par ailleurs, en analysant les bases de données du « The Cancer Genome Atlas » (TCGA), nous avons d'une part confirmé cette surexpression et d'autre part nous avons montré une corrélation entre la voie Wnt et TR α 1 dans les tumeurs. En utilisant le modèle de lignée cellulaire de CRC Caco2, nous avons confirmé l'action de TR α 1 sur la voie Wnt et l'altération de l'expression TR α 1 avait un effet sur les caractéristiques tumorales des lignées.

Notre analyse transcriptomique a révélé que des gènes inhibiteurs de la voie Wnt tels que *Wif1* et *Sox17*, étaient régulés négativement dans les tumeurs de souris *vil*-TR α 1/*Apc*^{1638N/+}. Nous proposons donc un nouveau modèle dans lequel TR α 1 active la voie Wnt. Il régulerait donc négativement l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition de la voie Wnt afin de favoriser la progression tumorale. L'ensemble de ces données montrent une forte implication de TR α 1

dans la tumorigenèse chez la souris et chez l'homme, et ouvrent des portes pour des recherches visant TR α 1 comme cible de traitement thérapeutique contre le CRC.

Modèles utilisés

Je détaillerai par la suite les différents modèles que j'ai étudiés au cours de ma thèse.

I. Modèles murins.

vil-TRα1 : afin de surexprimer TRα1 tout le long de l'épithélium intestinal, l'ADNc codant pour TRα1 a été placé sous le contrôle du promoteur de la Villine à l'aide du vecteur pVill-AatII. Après micro-injection, les fondateurs obtenus ont été croisés avec des souris au fond génétique C57BL6. Les souris *vil-TRα1* développent des cryptes hyperplasiques, des villosités plus petites mais plus larges par rapport aux souris WT, et quelques adénomes au niveau de l'intestin grêle et du colon (Kress et al., 2010).

Apc^{1638N/+} : une cassette codant pour la néomycine a été introduite en orientation antisens dans l'exon 15. Le résultat est une protéine tronquée au niveau du codon 1638. Cette mutation permet un taux de développement de tumeurs faible avec un nombre de polypes inférieur à 10 par souris au bout de 6 mois et des adénocarcinomes moyennement et hautement différenciés à 9 mois. Chez ce type de souris, un faible nombre d'individu développe des métastases hépatiques (Fodde et al., 1994)

vil-TRα1/Apc^{1638N/+} : les souris *vil-TRα1* ont été croisées avec les souris *Apc^{1638N/+}* dans un fond génétique permettant le développement tumoral, ici en l'occurrence une voie Wnt suractivée due à la mutation du gène *Apc*. Ces souris développent des adénomes à 3 mois, des adénocarcinomes et des micro-métastases au niveau du foie au bout de 6 mois (Kress et al., 2010).

TRα^{0/0} : une cassette *lacZ neo^r* a été introduite par recombinaison homologue entre l'exon 4 et 8 du gène *Thra*. Cela élimine d'une part la région liant l'ADN de TRα1 et TRα2, et d'autre part le promoteur interne situé dans l'intron 7 qui permet la transcription des isoformes TRΔα. Les

souris $TR\alpha^{0/0}$ ne présentent donc aucun transcrit du gène *Thra* et manifestent une diminution du taux de la T4, un retard de croissance et un retard de développement du squelette osseux. Au niveau de l'intestin grêle ces souris montrent des villosités réduites dues à une diminution du nombre de cellules dans l'axe crypto-villositaire. (Gauthier et al., 2001)

$TR\alpha^{0/0}/Apc^{1638N/+}$: les souris $TR\alpha^{0/0}$ ont été croisées avec des souris $Apc^{1638N/+}$ et les souris obtenues nécessitent plus de temps pour développer des tumeurs, et développent un plus faible nombre de tumeurs comparés aux simples mutants $Apc^{1638N/+}$ (données non publiées par l'équipe).

II. Modèle humain.

Caco2 (TC7) : la lignée humaine d'adénocarcinome de colon, TC7 est dérivée de la lignée parentale Caco2. Elle a été isolée après un passage tardif de cette dernière (198)(Caro et al., 1995; Sambuy et al., 2005; Turco et al., 2011). Cette lignée présente une mutation monoallélique au niveau du gène *APC* et une mutation au niveau du gène *K-ras* qui conduit à l'apparition de l'acide aspartique à la place d'une glycine en position 12 (Gayet et al., 2001; Ku et al., 2010).

RESULTATS

Article I

Article original en cours de finalisation :

**The overexpression of the thyroid hormone nuclear receptor TR α 1 characterizes
intestinal tumors with high Wnt activity**

Joel Uchuya-Castillo^{1,#}, Nicolas Aznar^{1,#}, Pierre Martinez¹, Carla Frau¹, Clementine Le Nevé¹,
Laetitia Marisa², Luiz O. F. Penalva³, Pierre Laurent-Puig⁴, Alain Puisieux¹, Jean-Yves Scoazec⁵,
Jacques Samarut⁶, Stephane Ansieau¹ and Michelina Plateroti^{1,*}

1: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de
Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, Département de la recherche, 69000 Lyon, France.

2: Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), Ligue Nationale Contre le Cancer, 75000
Paris, France. 3: Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center
at San Antonio, TX, 78229, USA. 4: UMR-S 1147, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France.

5: Institut Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France. 6: Institut de Génomique Fonctionnelle de
Lyon, ENS de Lyon, 69342 Lyon, France.

#: Equal contribution

*: Corresponding author

Mailing address: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), 28 Rue Laennec, 69373
Lyon, France.

Tel: 33 4 69166617

Fax: 33 4 78782720

E-mail: michelina.plateroti@univ-lyon1.fr

Abstract

Background. Our previous work demonstrated a key function of the thyroid hormone nuclear receptor TR α 1, a T3-modulated transcription factor, in controlling the intestinal development and homeostasis through the Wnt and Notch pathways. Interestingly, the overexpression of TR α 1 in the intestinal epithelium of a mutated *Apc* genetic background (*vil*-TR α 1/*Apc*^{+/^{1638N} mice) was responsible for accelerated carcinogenesis and more aggressive tumor phenotype compared to the simple *Apc* mutants. **The aim** of this study was to gain molecular insights into this synergistic oncogenic potential.}

Methods. We used an approach of transcription profile to define differentially expressed genes in *vil*-TR α 1/*Apc*^{+/^{1638N versus *Apc*^{+/^{1638N tumors. By bioinformatics we analyzed human cohorts of colorectal cancers and human and mouse tumor features were further analyzed by RTqPCR and immunolabeling. TR α 1 binding on genomic regions was studied by *in vivo* chromatin immunoprecipitation assay. Lentiviral-mediated TR α 1 loss-of-function and gain-of-function approaches were used to generate and analyze Caco2 cells (RTqPCR, IB, TopFlash-Wnt activity, proliferation and migration).}}}}

Results. We defined a comprehensive list of differentially expressed genes in tumors overexpressing TR α 1 that included several actors of the Wnt and Notch pathways, intestinal stem cell markers and genes closely correlated with cancer initiation and progression. Focusing on Wnt-related genes, we confirmed the relevance of our observation in a cohort of human adenocarcinomas revealing that TR α 1 levels and Wnt activity are directly and significantly correlated. Looking for molecular mechanisms responsible for this link we i) described the transcriptional repression of the Wnt Inhibitor Factor-1 by TR α 1, ii) confirmed the positive regulatory loop between TR α 1 and Wnt activity and, as consequence, iii) demonstrated that Caco2 cell migration and proliferation were strongly dependent upon TR α 1 expression levels.

In conclusion, our results underline an important functional interplay between the thyroid hormone nuclear receptor TR α 1 and the canonical Wnt pathway in both intestinal cancer initiation and progression. In addition we show for the first time a positive correlation between TR α 1 expression in human adenocarcinoma cell proliferation and migration.

Keywords: Intestinal cancer, Thyroid Hormone Nuclear Receptor, WIF1, Wnt pathway

**The overexpression of the thyroid hormone nuclear receptor TR α 1 characterizes
intestinal tumors with high Wnt activity**

Joel Uchuya-Castillo^{1,#}, Nicolas Aznar^{1,#}, Pierre Martinez¹, Carla Frau¹, Clementine Le Nevé¹, Laetitia Marisa², Luiz O. F. Penalva³, Pierre Laurent-Puig⁴, Alain Puisieux¹, Jean-Yves Scoazec⁵, Jacques Samarut⁶, Stephane Ansieau¹ and Michelina Plateroti^{1,*}

1: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, Département de la recherche, 69000 Lyon, France. 2: Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), Ligue Nationale Contre le Cancer, 75000 Paris, France. 3: Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, 78229, USA. 4: UMR-S 1147, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France. 5: Institut Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France. 6: Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon, 69342 Lyon, France.

#: Equal contribution

*: Corresponding author

Mailing address: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), 28 Rue Laennec, 69373 Lyon, France.

Tel: 33 4 69166617

Fax: 33 4 78782720

E-mail: michelina.plateroti@univ-lyon1.fr

Abstract

Background. Our previous work demonstrated a key function of the thyroid hormone nuclear receptor TR α 1, a T3-modulated transcription factor, in controlling the intestinal development and homeostasis through the Wnt and Notch pathways. Interestingly, the overexpression of TR α 1 in the intestinal epithelium of a mutated *Apc* genetic background (*vil*-TR α 1/*Apc*^{+1638N} mice) was responsible for accelerated carcinogenesis and more aggressive tumor phenotype compared to the simple *Apc* mutants. **The aim** of this study was to gain molecular insights into this synergistic oncogenic potential.

Methods. We used an approach of transcription profile to define differentially expressed genes in *vil*-TR α 1/*Apc*^{+1638N} versus *Apc*^{+1638N} tumors. By bioinformatics we analyzed human cohorts of colorectal cancers and human and mouse tumor features were further analyzed by RTqPCR and immunolabeling. TR α 1 binding on genomic regions was studied by *in vivo* chromatin immunoprecipitation assay. Lentiviral-mediated TR α 1 loss-of-function and gain-of-function approaches were used to generate and analyze Caco2 cells (RTqPCR, IB, TopFlash-Wnt activity, proliferation and migration).

Results. We defined a comprehensive list of differentially expressed genes in tumors overexpressing TR α 1 that included several actors of the Wnt and Notch pathways, intestinal stem cell markers and genes closely correlated with cancer initiation and progression. Focusing on Wnt-related genes, we confirmed the relevance of our observation in a cohort of human adenocarcinomas revealing that TR α 1 levels and Wnt activity are directly and significantly correlated. Looking for molecular mechanisms responsible for this link we i) described the transcriptional repression of the Wnt Inhibitor Factor-1 by TR α 1, ii) confirmed the positive regulatory loop between TR α 1 and Wnt activity and, as consequence, iii) demonstrated that Caco2 cell migration and proliferation were strongly dependent upon TR α 1 expression levels.

In conclusion, our results underline an important functional interplay between the thyroid hormone nuclear receptor TR α 1 and the canonical Wnt pathway in both intestinal cancer initiation and progression. In addition we show for the first time a positive correlation between TR α 1 expression in human adenocarcinoma cell proliferation and migration.

Keywords: Intestinal cancer, Thyroid Hormone Nuclear Receptor, WIF1, Wnt pathway

Introduction

The intestinal epithelium is a very dynamic tissue continuously renewed by stem cells and committed progenitors located in the crypts of Lieberkühn¹. Its development and homeostasis involve several signaling pathways, including Wnt, Hedgehog, Notch and BMP that cross-regulate each other and maintain the balance among critical biological processes such as proliferation, differentiation and apoptosis². Importantly, their deregulation is correlated with tumor induction and/or the progression³⁻⁵. Intestinal cancer is known to develop through a defined series of histological changes called ‘adenoma–carcinoma’ sequence. Each step is characterized by genetic alteration of a specific oncogene or tumor suppressor gene^{6, 7}. Interestingly, these genes are components of the molecular pathways that control the homeostasis of the intestinal epithelium. Thus, symmetry exists between their roles in gut physiology and in tumor initiation and/or progression. This is particularly well characterized in the case of the canonical Wnt pathway, for which the mammalian intestine is one of the most-studied paradigms^{8,9}.

Within this context, several studies demonstrated that thyroid hormone (TH) signaling is also a key regulator of gastrointestinal development and homeostasis in both amphibians and mammals^{10, 11}. THs act *via* the thyroid hormone nuclear receptors, the TRs, which belong to the nuclear hormone receptor transcription factor superfamily¹² and whose activity is modulated by the hormone T3¹³. TRs regulate the transcription of target genes, both in a positive and negative manner, by binding to specific DNA sequences named thyroid hormone response elements (TREs) and by co-factors recruitment upon T3 binding¹³. Studies on *Thra* and/or *Thrb* knockout animals showed the TR α 1 nuclear receptor is responsible for TH signaling in the intestine, where it controls the balance between cell proliferation and cell differentiation in the intestinal crypt cells¹⁴⁻¹⁶. Notably, TH also affects the expression of several genes of the Wnt and Notch pathways in these cells¹⁷, including genes that have been

described in the *Lgr5*^{high} stem cell signature¹⁸. In particular we identified a complex functional interaction between TH-TR α 1 and Wnt^{15, 17, 19} and described multilevel interactions between these two signals²⁰ that includes transcriptional regulation¹⁵⁻¹⁷, physical interaction¹⁹ and oncogenic synergism²¹. As regarding the synergism we demonstrated for the first time the tumor-inducing potential of TR α 1 when overexpressed specifically in the intestinal epithelium (*vil*-TR α 1 mice) in a mutated *Apc*-background (*vil*-TR α 1/*Apc*^{+1638N})²¹. In particular, the *vil*-TR α 1/*Apc* mice were characterized by an acceleration of tumor appearance, progression and aggressiveness compared with the simple *Apc* mutants²¹. An hyper-activated Wnt was specifically observed in the double compound mice. However, the underlying mechanisms involved in the oncogenic synergy remained elusive.

In order to define in detail the basis of TR α 1-dependent cancer development and aggressiveness we performed a transcription profile analysis in tumors developing in *vil*-TR α 1/*Apc*^{+1638N} and *Apc*^{+1638N} mice. Statistics and bioinformatics analyses confirmed a significant correlation between the dataset and the Wnt pathway. We focused in particular on Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) that was strongly down-regulated in *vil*-TR α 1/*Apc*^{+1638N} adenocarcinomas, in line with Wnt pathway hyper-activation we previously described in these tumors²¹. Indeed, *Wif1* gene encode for a secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activity²². We determined an inverse correlation between TR α 1 and *Wif1* expression levels in tumors from mice of different *Thra* genotype and molecular analyses defined a direct transcriptional regulation of *Wif1* gene by TR α 1. Importantly, the relevance of these observations has been confirmed in human colorectal cancers. Finally, studies on Caco2 adenocarcinoma cells definitively confirmed that Wnt activity depends upon TR α 1 therefore affecting both cell migration and proliferation.

Materials and Methods

Animals and sample collection

We used WT as well as $TR\alpha^{0/0}$,²³ $vil-TR\alpha1$ ²¹, $Apc^{+/1638N}$,²⁴ simple mutants and $vil-TR\alpha1/Apc^{+/1638N}$,²¹ compound mice. Animals were housed in the same animal facility and received standard mouse chow and water ad libitum.

Comparative transcriptomic analysis was performed on tumors from $vil-TR\alpha1/Apc^{+/1638N}$ and $Apc^{+/1638N}$. Animals were sacrificed and portions of normal mucosae and tumors were quickly removed under a binocular microscope. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C for RNA extraction or fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for histological and immunolabelling approaches.

Animals were maintained with approval from the local animal experimental committee. All the experiments were performed in compliance with the French and European guidelines for experimental animal studies and approved by animal experimental committees "Comités d'Ethique en Experimentation Animale de l'Université de Lyon" (C2EA15; registration number DR2013-55)", the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation, Secrétariat "Autorisation de projet" (agreement 02847.01).

Transcriptome analysis

RNA Extraction, Purification and Quality Control. Total RNA was extracted from tumors, by using the RNeasy mini kit and treated with DNase (Qiagen), according to manufacturer's instructions. The RNA samples were analyzed quantitatively and qualitatively by NanoDrop ND-2000 UV (Thermo Scientific) and by BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). Only good quality RNAs were further processed for microarray analysis: high R.I.N. (RNA Integrity Number), 260/280 nm absorbance >1.8 and 260/230 absorbance >2 .

Microarray hybridization and data analyses. Labeling, hybridization and detection were carried out by the Biopuces et Séquençage platform at IGBMC (Illkirch, France). Gene expression was determined by hybridization to the Mouse GE 4x44K v2 Microarray Kit (Agilent Technologies). Three independent samples were hybridized for each experimental condition.

The raw data after hybridization were imported to the GeneSpring GX v 11.5 Software (Agilent Technologies) in order to be processed, normalized, filtered and analyzed. The procedure includes 4 steps: i) Normalization, ii) Filtration, iii) Identification of differentially expressed genes and iv) Hierarchical Clustering.

i) Normalization is the process of adjusting values to improve consistency and reduce bias.

ii) Filtration of genes is an essential step to limit the number of false positives, in order to perform the statistics on a robust list of genes. Only the probes present in at least one experimental condition were retained. The criteria of filtration were:

- Uniformity between groups;
- Population non-outlier;
- Unsaturated signal;
- Signal above the background noise.

iii) Statistical tests were applied to identify differentially expressed genes in different experimental conditions. We used the unpaired Student' T-test and the One-way ANOVA test; in both cases additional corrections methods of the P-values were performed to reduce the number of false positives. For T-test the correction method Benjamini-Hochberg was applied while for One-way ANOVA Newman-Keuls correction was performed.

iv) Hierarchical clustering identifies group of genes logically associated. As a similarity measure, the Pearson centered correlation was used.

Ingenuity Pathway Analysis (IPA). The association between the genes was further evaluated using the Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). Agilent identifiers of the differentially expressed genes and their corresponding expression values (represented as fold change) were loaded into the software and mapped to its corresponding gene object in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. The significance of the associations in functional groups, networks or canonical pathways used the Fisher's exact test to calculate a P-value. This estimated the probability that a particular functional classification or category of genes is associated with a particular pattern or cluster of gene expression more than would be expected by chance. Networks of these focus genes were algorithmically generated based on the relationships of individual genes as derived from the literature review and used to identify the biological functions and/or associated pathological processes. Genes or gene products are represented as nodes, and biological relationships between nodes are represented as edges (lines). All edges are supported by at least one literature reference from canonical information stored in the Ingenuity Pathways Knowledge Base.

Bioinformatics analysis of the TCGA database

The expression data for 696 colorectal adenocarcinoma (COAD) TCGA samples were downloaded as normalized values from RNA-seq RSEM analyses. The hallmark gene sets from the Molecular Signature Database ²⁵ and the GenePattern 2.0 ²⁶ website were used to score the Wnt signaling per sample (HALLMARK_WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING). The Wnt scores and TRα expression were compared using a squared Pearson correlation coefficient (R²). All analyses were performed in R ²⁷.

Human Colorectal Tumor Samples and analyses

One cohort of 59 human primary colorectal tumors (with normal tissue counterparts) was provided by the Tumor Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon (CRB Hospices Civils de Lyon, BB-0033-00046, agreements AC2008-73 and DC2008-72). The tissue bank conforms to French regulations. All patients have given written informed consent to the use of tissue samples for research purposes. Procedures for collection, storage and release of tissue samples are in accordance with national and international recommendations and a quality management program has been developed. To preserve anonymity, a specific ID was attributed to each patient. Fresh tumor and peritumoral colon tissue samples were obtained from surgical resections performed prior to any systemic therapy; tissue samples were immediately snap frozen in liquid nitrogen and used for RNA extraction and RTqPCR analysis. A second cohort was from BioChain (colon cancer microarray plate) and included 24-paired samples (healthy part and tumor from the same patient).

RNA extraction and RTqPCR analysis

Total RNA was extracted by using the Nucleospin RNA Kit (Machery-Nagel). To avoid the presence of contaminating DNA, DNase digestion was performed on all preparations. Reverse transcription was performed with the iScript reverse transcriptase (Bio-Rad) on 1 μ g of total RNA according to the manufacture's instructions. For qPCR approaches the SYBR qPCR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara) was used in a CFX connect apparatus (Biorad). In each sample specific mRNA expression has been quantified by using the Δ Ct/ $\Delta\Delta$ Ct method and values normalized to *Ppib*/*PPIB* (mouse/human) levels. Primers are listed in Table S1.

Immunofluorescence and immunohistochemistry

Paraffin sections (5- μ m thickness) were used for indirect immunostaining. Briefly, the sections were deparaffinized in methylcyclohexane, hydrated in ethanol (100%, 90% and

75%), and washed with PBS. The slides were subsequently subjected to antigen retrieval using microwave heating (252 Watts) in 0.01 M citrate buffer, pH 6, and incubated for one hour at room temperature with blocking buffer (10% normal goat serum, 1% BSA and 0.02% Triton X-100 in PBS). The slides were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubation with fluorescent secondary antibodies (Alexa Fluor, Life Technologies, 1:1000). All nuclei were stained with Hoechst (33342 Molecular Probes®). We used the following primary antibodies: anti-TR α (Abcam, ab53729, dilution 1:250), anti-WIF1 (Thermo Fisher, dilution 1:250). Fluorescence microscopy and imaging was performed on a Nikon NIE imager right microscope.

Immunohistochemistry on human paraffin samples were performed by the Anatomopathology service (Hopital Herriot, Lyon) and the Anatomopathology Research platform (Centre Leon Berard).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and qPCR analysis

The chromatin immunoprecipitation study was performed on collagenase/dispase separated epithelial fragments from 3-6 day mouse intestine as previously described¹⁷. We used anti-TR α ¹⁷ or anti-GFP (Sigma) as negative controls. Specific DNA fragments were analyzed by qPCR using a SYBR green PCR master mix (Qiagen) in an MxP3000 apparatus (Stratagene). qPCR products have also been separated and visualized in 2% agarose gel. We designed primers to amplify a 100bp sequence containing the putative TRE within the *Wif1* promoter, as well as a 100bp sequence located 3Kb downstream of the putative TRE (negative control). In our study we also included primers to amplify genomic regions of already established TR α 1 target genes such as *Sfrp2* and *Cttnb1*¹⁷. Primer sequences are listed in Table S1; the amplified genomic sequence of *Ppia* gene was used in all reactions as internal control.

Cell proliferation and wound healing assay in Caco2 cells

The studies were performed on the human Caco2 colorectal cancer cell line, clone TC7²⁸. ShRNA lentiviral vectors were Mission-shRNA (derived from pLKO.1-puro, Sigma); Sh sequences targeting TR α 1 are listed in Table S1. For overexpression experiments, the TR α 1 cDNA was inserted in Mission® pLKO.1-puro vector (Sigma). The lentiviral particles were generated in our P3 facility and infected cells selected with 1 μ g/ml puromycin.

Caco2 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum. For cell proliferation studies 5x10³ cells/well were seeded in 96-well plates (Essen Bioscience) and monitored for 70 hours. For wound healing assay 50x10³ cells/well were seeded in 96-well plates in non-proliferative condition (in the absence of serum) and the wound was performed the following day using the WoundMakerTM (Essen Bioscience). We then monitored the healing during 70 hours. Both assays were performed and analyzed by using the Incucyte ZOOMTM apparatus and associated software.

Luciferase reporter assay

Caco2 cells were seeded in 24-well plates (1x10⁶ cells/well) in DMEM supplemented with 5% heat-inactivated foetal calf serum. We monitored the Wnt activity using the following vectors: Topflash and Fopflash (Upstate; 200 ng/well); pCneo- β -cateninXL (100 ng/well); EVR2-TCF4E (100 ng/well); pCMV-TK (1 ng/well; Promega). The plasmids were transfected using the Exgen 500 transfection reagent (Euromedex). Luciferase activity was measured 48h post-transfection using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Immunoblotting

Protein samples from Caco2 cells (50 μ g per lane) were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes 0.2 μ m (Amersham). Membranes were blocked with TBS-

Tween (Euromedex) supplemented with 5% non-fat milk before incubation anti-TR α (Abcam, dilution 1: 500), anti-Actin (Sigma, dilution 1:10,000) primary antibodies. This step was followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies (Promega). The signal was analyzed using an enzymatic chemiluminescence detection kit (LumiLight, Roche) and image detection was performed using a Chemidoc XRS+ imaging system (Bio-Rad) according to manufacturer's protocol. All images were processed using Image J software.

Anchorage-dependent tumor growth assay

Anchorage-dependent growth was monitored on solid (plastic) surface as described previously²⁹. Briefly, 10³ Caco2 TR α 1-depleted or TR α 1-overexpressing cells were plated in 6-well dishes and incubated in 5% CO₂ at 37°C for 2 weeks in DMEM 10% FBS-supplemented medium. Colonies were then stained with 0.005% crystal violet for 1 hour. Each experiment was performed in triplicate and images were analyzed by using Image J software to quantify colony size.

Results

TR α 1-dependent molecular features of intestinal adenocarcinomas

To define the molecular differences of adenocarcinomas from *vil*-TR α 1/*Apc*^{+1638N} mice (from here *vil*-TR α 1/*Apc*) compared with the simple *Apc* mutants, we performed a transcriptomic analysis. We used two statistical approaches to identify significant differentially expressed genes (Figure S1) and retained only the genes pinpointed by both approaches for subsequent analyses (Figure S1; Table S2). The hierarchical clustering clearly grouped the genes depending on the tumor genotype (Figure S2), while the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) identified biological functions significantly associated with the dataset that included 1) Cellular growth and proliferation, 2) Cellular development and 3) Cancer (Figure S3). IPA library also helped identifying the most significant Canonical Pathways within the dataset (Figure S4). Interestingly, the most significant pathways were the Cdc42, that is related to cell division and cell cycle, and the Wnt/ β -catenin pathway, that was already correlated with TR α 1 function²⁰. Finally, the data set was also processed by the Network Generation tool and the most interesting network "Cellular Growth, Cell Proliferation and Cancer" was composed of 26 significant genes (Figure 1, Table S3). It is worth to underline, that in this network together with genes encoding for membrane channels and linked to cell movement and/or calcium flux, several genes of the Wnt pathway are present including activators, inhibitors and modulators. In particular, several Wnt inhibitors were strongly repressed in tumors overexpressing TR α 1. Table S4 summarizes genes belonging to several categories analyzed by RTqPCR.

Inverse correlation between TR α 1 and Wif1 expression in mouse adenocarcinomas

We decided to focus on the Wnt-inhibitor Factor 1 (*Wif1*) to further analyze the relevance of its down-regulation in TR α 1-overexpressing tumors. Indeed, *Wif1* has been described as a negative regulator of Wnt activity²² and its strong repression in TR α 1-overexpressing tumors could give a rationale to the increased Wnt activity observed in these tumors²¹.

First of all we validated the microarray data by RTqPCR (Table S4) and then analyzed comparatively TR α 1 and *Wif1* mRNA expression in tumors from *Apc* and *vil*-TR α 1/*Apc* mice (Figure 2 A,B). As expected, *vil*-TR α 1/*Apc* mice showed an increase of TR α 1 mRNA expression in both healthy mucosae and tumors, significantly higher than in *Apc* (normal parts or tumors) (Figure 2A). *Apc* tumors showed a significant increase of TR α 1 expression compared with normal *Apc* mucosae that remained, however, lower compared with the *vil*-TR α 1/*Apc* normal intestine or tumors (Figure 2A). *Apc* tumors also displayed an up-regulation of *Wif1* mRNA compared with healthy *Apc* mucosae (Figure 2B). In *vil*-TR α 1/*Apc* tumors the transgenic expression of TR α 1 associated with a significant down-regulation of *Wif1* mRNA expression as compared to *Apc* tumors. Immunostaining of *Apc* tumor sections showed heterogeneous expressions of both TR α 1 and WIF1 proteins (Figure 2C). Of note, WIF1 expression domains within the tumors were stronger in regions harbouring lower TR α 1 staining (Figure 2C). Finally, consistent with the mRNA expression levels, WIF1 protein was not detectable in *vil*-TR α 1/*Apc* tumor sections (Figure 2D).

Taken together, these results support the model in which TR α 1 enhances Wnt signaling pathway at least in part by inhibiting WIF1 expression *in vivo*.

***Wif1* gene is transcriptionally controlled by TR α 1**

The results described in the previous sections compelled us to investigate the presence of a TRE in the promoter of *Wif1* gene in order to elucidate whether TR α 1 may bind and regulate *Wif1* gene transcription. Using an *in silico* approach (<http://www.nubiscan.unibas.ch/>) we

found a putative TRE organized as a canonical DR4 repeat¹³, located in the position -3555 from the transcription start site (Figure S5 A,B). To check whether TR α 1 can bind the *Wif1*-TRE *in vivo*, we used a chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach. The ChIP assay was performed on fresh epithelial preparations from WT mouse intestine using anti-TR α 1, anti-GFP or rabbit IgG (negative controls). As shown (Figure 3; Figure S6), TR α 1, but not GFP, bound to the *Wif1* promoter region containing the *Wif1*-TRE site. The percentage of TR α 1 binding *in vivo* was similar to that previously described for *Sfrp2*-TRE¹⁷ or *Ctnnb1*-TRE¹⁵ (Figure 3); no specific binding was detected on *Rplp0* (36B4) gene promoter or in a region of *Wif1* gene located 3Kb upstream of the TRE site. (Figure 3).

TR α 1 expression levels control colon adenocarcinoma cell phenotype *in vitro*

To investigate the role of TR α 1 in the modulation of key cellular phenotypes regulated by Wnt signaling during tumorigenesis, that is, cell proliferation/growth and migration we used the Caco2 adenocarcinoma cells in which transformation is driven by the presence of mutated APC protein and therefore activated Wnt/ β -catenin signaling³⁰. These cells endogenously express TR α 1 and have been previously used to study the interplay between TR α 1 and the canonical Wnt in human colon cancer context¹⁹. The parental cell line has been engineered by lentiviral-mediated TR α 1 expressing or silencing (Sh-RNA) particles enabling to develop TR α 1 gain-of-function and loss-of-function Caco2 cell lines. We confirmed the efficiency of two Sh-RNA (mentioned as Sh1 and Sh2) against TR α 1 and that of TR α 1 overexpression by qPCR and Immunoblot (IB) respectively (Figure 4 A,B; Figure S7 A,B).

First, we investigated if TR α 1 expression levels could modulate Wnt activity in the different Caco2 cell lines by using the TopFlash Wnt-reporter assay. As expected in control cells (Sh-Src) the co-transfection of β -catenin/TCF4 together with TopFlash significantly increased the luciferase activity compared with non-cotransfected cells (Ctrl). Compared to Sh-Src, both

Sh1 and Sh2 showed a strong and significant decrease of TopFlash-dependent Wnt activity in both control and β -catenin/TCF4 conditions (Figure 4C), while TR α 1 overexpression conversely potentiated the Wnt activity (Figure S7C). When using the PopFlash vector, harbouring mutated Wnt response elements, luciferase activity was not modulated by alterations of TR α 1 expression levels, showing the specificity of the response (Figure 4D, S7D).

Next, we analyzed whether TR α 1 alteration could affect key cellular phenotypes regulated by Wnt signaling. Interestingly, we found that depletion of TR α 1 inhibited anchorage-dependent cell growth/cell proliferation (Figure 5 A,B) and cell migration (Figure 5 C,D), while TR α 1 overexpression increased anchorage-dependent cell growth/cell proliferation (Figure S7E). In this setting cell migration was not affected (not shown), probably due to the endogenous TR α 1 expression in these cells.

Taken together, these findings demonstrate that TR α 1 levels not only regulate positively the canonical Wnt signaling pathway in colon cancer cells but also affect cell proliferation and cell migration.

Relevance in human colorectal cancer patients

In order to define whether our data in mouse *in vivo* and in human cell lines *in vitro* have a relevance in human colorectal cancer (CRC) patients, we interrogated the TCGA database (<http://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/tcga/>) and the molecular groups defined in Marisa *et al.*³¹ to analyse *in silico* the expression levels of *THRA* gene. Interestingly, in TCGA colorectal tumors the levels of *THRA* expression significantly and directly correlated with Wnt activity (Figure 6A). *THRA* expression values in the CRC molecular subtypes presented a great dispersion (Figure 6B). Nevertheless, four out of the six groups significantly overexpressed *THRA* (Figure 6B). To validate experimentally at the mRNA level TR α 1

overexpression in human colon lesions we analyzed two cohorts of patients, including healthy mucosae and cancers (Figure 6D). As expected from the studies *in silico*, we observed some heterogeneity in TR α 1 expression level in tumors compared with their respective healthy mucosae, but approximately 40% of them presented increased TR α 1 mRNA expression. Interestingly, the heterogeneous pattern of TR α 1 protein expression in tumors from Apc-mutant mice was also present in human adenocarcinomas, in which we could clearly visualise TR α 1-expressing nuclei while in normal parts TR α 1 was not detectable (Figure 6C).

Finally, we checked whether *WIF1* mRNA expression followed a similar inverted correlation with TR α 1 mRNA expression, as it was the case for the murine tumors. Interestingly, we observed a decrease of *WIF1* mRNA expression by RTqPCR analysis in tumors compared with the healthy mucosae in the cohorts of patients (Figure S8). To better define this correlation we compared TR α 1 and WIF1 expression in each tumor, each expression value represented as fold change relative to the respective healthy counterpart from the same patient (Figure 6E). As already underlined, within the cohorts we could distinguish tumors expressing high- or unchanged/low-levels of TR α 1 (red dots, TR α 1-high; black dots, TR α 1-unchanged/low). Looking to *WIF1* expression in the two groups, it was clear that low *WIF1* expressing tumors (red squares) were essentially those expressing higher levels of TR α 1.

Altogether these results indicate that an inverse correlation exists between TR α 1 and *WIF1* in human colon cancer parallel to a direct correlation between TR α 1 and Wnt activity.

Discussion

The gastrointestinal tract is a well-characterized target of THs and of their nuclear receptors TRs^{32, 33}. The paradigm is its important remodelling in amphibians during TH-dependent metamorphosis. Indeed, in this context THs behave as multi-tissue reprogramming factors: some organs are lost (*i.e.* tails), others undergo *de novo* formation (*i.e.* lung) or are remodelled (*i.e.* intestine), to permit the juvenile animal to acquire adult features and survive within a new environment³⁴. Interestingly, several studies have described the conservation of this hormonal signal during intestinal development in mammals¹⁰, where its function is extended to intestinal homeostasis, stem cell physiology and progenitor commitment as well as to tumor development^{16, 17, 21, 35}. Importantly the functions of the TRs are coordinated by and integrated with other signaling pathways including the Wnt/ β -catenin^{15, 17}, which plays a pivotal role in intestinal pathophysiology³⁶⁻³⁸. Indeed, several studies clearly showed multilevel interactions between TRs and the Wnt signalling pathway, including the control of gene expression, physical interactions and functional synergism³⁹⁻⁴³. In this context, we were able to show that TR α 1 induces Wnt and Notch pathways in intestinal crypt progenitor cells^{16, 17} by a mechanism including transcriptional control of *Ctnnb1* and *Sfrp2* genes as well as stabilization of β -catenin^{15, 17}. Regarding the Notch pathway, we showed direct and indirect transcriptional controls on Notch ligands and receptor¹⁶. It is worth noting that Wnt and Notch synergize to accelerate intestinal tumor development³. In agreement with the literature and considering the key role of altered Wnt signalling in gut tumor development⁴⁴, we were not surprised to observe that TR α 1 targeted overexpression in a mutated Apc background (*vil-TR α 1/Apc* mice) resulted in accelerated and more aggressive tumor development compared with the simple Apc mice²¹. A peculiarity of the TR α 1-overexpressing tumors was an over-activated Wnt, but we lacked an integrated view of the entire program triggered by TR α 1 overexpression.

By using a comparative transcription profile approach we established that overexpression of TR α 1 in an Apc-mutated tumor context results in a very high number of differentially expressed genes, positively or negatively regulated. Given that we were interested in understanding the basis of the Wnt hyper-activation we decided to focus on this pathway, that was also one of the most significantly represented in our data set (P-value, 1.9×10^{-5}). Intriguingly, several inhibitors of Wnt were strongly down-regulated in *vil*-TR α 1/Apc tumors, indicating that through down-regulation of Wnt antagonists TR α 1 is able to hyper-activate this pathway, according to our previous data ²¹. In this context WIF1 appeared of particular interest: it is an inhibitor of Wnt ²², is strongly down regulated by TR α 1 overexpression and a large literature also links decreased Wif1 expression with increased tumorigenesis or induction of more aggressive tumors ⁴⁵⁻⁴⁷. Interestingly, our results showed that Wif1 expression, that is induced in Apc tumors, is strongly repressed in *vil*-TR α 1/Apc tumors. We postulate that *Wif1* expression may depend on the balance between Wnt and TR α 1 activities: Wnt increases and TR α 1 decreases its expression, the final outcome depending on the relative strengths of each of these actions. Importantly and in support of this assumption, we showed that *Wif1* regulation by TR α 1 depends on its specific binding through a canonical TRE present on the murine *Wif1* promoter, resulting in transcriptional inhibition. We could map a putative TRE within the promoter of the human *WIF1* gene (Figure S9), strongly indicating that a similar mechanism of transcriptional regulation by TR α 1 is present in mouse and in human *Wif1*/*WIF1* promoters, as also suggested by the analysis of the tumor cohorts. As concerning the regulation of *Wif1*/*WIF1* by Wnt, the mechanism remains undefined. In addition, according with the literature, *Wif1*/*WIF1* gene can be hypermethylated and therefore suppressed in CRC ^{48, 49}. However, overexpression of *Wif1* has been reported in lesions from Apc^{+Min} mice ⁵⁰, in agreement with our data on Apc^{+1638N} strain, or in lesions of mice treated

with carcinogenic agents^{51, 52}. In these papers authors suggest that *Wif1* induction represents a response against oncogenic events^{51, 52}, including strong Wnt signaling, therefore implying that the expression of *Wif1* may be considered a hallmark of a carcinogenetic event. Altogether, these reports as well as our data do not exclude other eventual mechanisms involved in the regulation of *Wif1* during the process of tumor initiation and progression.

Considering the large list of differentially expressed genes, we can easily envisage that other genes/mechanisms are involved in accelerating the tumor process by TR α 1 overexpression in relation with Wnt hyper-activation. *Sox17*, which is strongly repressed in the *vil*-TR α 1/Apc tumors (fold change: -55.62), is described as an antagonist of the Wnt pathway since it inhibits the β -catenin activity by sequestration⁵³. In addition, it is frequently methylated in cancers⁵⁴⁻⁵⁶ and the inhibition of its expression is associated with proliferation^{57, 58}, tumor progression⁵⁹ and poor prognosis in colon cancer patients⁶⁰. Conversely, its re-expression controls processes such as the epithelial-mesenchymal transition and the onset of metastasis⁶¹. The ZNRF3/RNF43 membrane complex is also a negative regulator of the Wnt pathway by promoting β -catenin degradation through the proteasome⁶². Also in this case their expression is negatively regulated in *vil*-TR α 1/Apc tumors (*Znrf3*: -4.15; *Rnf43*: -8.25). Similarly, their expression is frequently altered in CRC⁶³, and their decreased expression is correlated with tumor progression in several cancers, including CRC^{64, 65}. Of note, this complex is inhibited by the LGR4/5/6 receptors⁶⁶. Intriguingly, *Lgr5*, the most studied intestinal stem cell marker⁶⁷, is negatively regulated in TR α 1-overexpressing tumors (fold change: -11.81), which seems counter-intuitive in relation with the increased aggressiveness of the TR α 1-overexpressing tumors. Nevertheless, a study showed that RSPO2 interacts with LGR5 to stabilize ZNRF3, thus acting in a negative feedback loop of the Wnt pathway⁶⁶. As all these actors are down regulated, the negative feedback loop is probably lost in *vil*-

TR α 1/Apc tumors, possibly participating to the overall hyper-activated Wnt. On the other hand, contradictory results describe *LGR5* expression in human intestinal cancers and/or intestinal cancer stem cells, suggesting to carefully consider its appropriateness as a cancer stem cell marker⁶⁸. Taken together our previous and current data suggest that TR α 1 promotes the induction of the Wnt pathway by stimulating several Wnt actors in physiological condition while in cancers it also inhibits Wnt antagonists, as it is the case for WIF1. Finally, the Wnt is not the only pathway regulated in our analysis and the acceleration of the carcinogenic process depending on TR α 1 is probably the result of the addition of multiple gene alterations, which is in line with the Vogelstein model⁶⁹.

Even if a consensus concerning alterations of circulating TH levels and gastrointestinal tumor development and/or progression has not been reached⁷⁰, our work definitively demonstrated that the TR α 1 receptor is capable of promoting tumor initiation and progression. In fact, we show here that the cooperation between TR α 1 and the Wnt pathway affects multiple signaling pathways, tumor suppressors and oncogenes. Importantly, we also validated the relevance of TR α 1 overexpression in human colon cancers and showed for the first time in this context that a direct correlation exists between TR α 1 and Wnt activity. The importance of this result has been further stressed by the fact that inhibition of TR α 1, and thus of Wnt activity, is able to impair the tumor phenotype of colon cancer cells (proliferation and migration), while TR α 1 overexpression has the opposite effect. In addition, loss of TR α 1 expression in TR α ^{0/0}/Apc mice is responsible for a delayed tumor development and decreased tumor number compared with Apc mutants (Tables S5), probably because of decreased Wnt activity in a TR α -KO background¹⁵. These findings strongly underline a major role of TR α 1 in tumor biology promoting tumor progression and eventually more aggressive tumor types. We have noticed, however, a strong inter-individual variability in mouse and human tumors as well as a

heterogeneous pattern of TR α 1 expression within the same tumor. These data perfectly illustrate the individual as well as the intra-tumoral heterogeneity in relation with specific molecular characteristics, as already described⁷¹⁻⁷⁴. Importantly, intra-tumoral heterogeneity has been reported to have a role in chemoresistance⁷¹ and also described as a mark of poor prognosis⁷⁵. If and how the heterogeneity of TR α 1 expression confers an advantage to the CRC and/or impairs efficiency of anti-cancer treatments are important open questions.

In conclusion, our study underlined the importance of increased TR α 1 expression in intestinal cancer development and progression and described for the first time the relevance of TR α 1 expression in human colon cancers. From our analysis it could be proposed that TR α 1 together with specific Wnt actors, such as WIF1, that are molecular targets of this nuclear receptor, can help define more aggressive tumors and eventually help defining more accurate and precise approach of precision medicine to specifically treat TR α 1/Wnt-high tumors in patients.

Acknowledgements

We are grateful to Manon Prativiel and Nadine Aguilera for their assistance with animal handling and care within the animal facilities AniCan (CRCL) and PBES (ENS de Lyon). We wish to thank Christos Coucoravas and Francesca Cambuli for realizing the very first steps of this work and Professor Alessandro Weisz for his help with bioinformatics. We also thank B. Manship for critical reading of the manuscript.

The work was supported by Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant No PGA1201402000834) and by the Département du Rhône de la Ligue contre le cancer (grant No 137838). JUC received support by the Ligue Nationale contre le cancer and the Fondation ARC; NA received support by the Fondation ARC.

Author Contribution

JUC: design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; NA: design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; PM/CF/CLN/LM/LOFP: collection and assembly of data, data analysis and interpretation; PLP/AP/JYS/JS: data analysis and interpretation; SA: design, data analysis and interpretation; MP, conception and design, assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, financial support. All authors approved the manuscript.

Conflict of Interest

The authors have no competing interests.

Bibliography

1. Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, et al. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:702-9.
2. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.
3. Fre S, Pallavi SK, Huyghe M, et al. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:6309-14.
4. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:415-24.
5. Radtke F, Clevers H, Riccio O. From gut homeostasis to cancer. *Curr Mol Med* 2006;6:275-89.
6. Hamilton S, Vogelstein B, Kudo S. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. WHO Classification of Tumours. (2) 105-119, (2000). 2000.
7. Fearon ER, Jones PA. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 1992;6:2783-90.
8. Leedham SJ, Schier S, Thliveris AT, et al. From gene mutations to tumours--stem cells in gastrointestinal carcinogenesis. *Cell Prolif* 2005;38:387-405.
9. Rizvi AZ, Hunter JG, Wong MH. Gut-derived stem cells. *Surgery* 2005;137:585-90.
10. Sirakov M, Plateroti M. The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:938-46.
11. Sun G, Roediger J, Shi YB. Thyroid hormone regulation of adult intestinal stem cells: Implications on intestinal development and homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord* 2016;17:559-569.
12. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 2003;116:585-6.
13. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21:193-208.
14. Plateroti M, Chassande O, Fraichard A, et al. Involvement of TRalpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* 1999;116:1367-78.
15. Plateroti M, Kress E, Mori JI, et al. Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:3204-14.
16. Sirakov M, Boussouar A, Kress E, et al. The thyroid hormone nuclear receptor TRalpha1 controls the Notch signaling pathway and cell fate in murine intestine. *Development* 2015;142:2764-74.
17. Kress E, Rezza A, Nadjar J, et al. The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor alpha1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *J Biol Chem* 2009;284:1234-41.
18. Munoz J, Stange DE, Schepers AG, et al. The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J* 2012;31:3079-91.
19. Sirakov M, Skah S, Lone IN, et al. Multi-level interactions between the nuclear receptor TRalpha1 and the WNT effectors beta-catenin/Tcf4 in the intestinal epithelium. *PLoS One* 2012;7:e34162.

20. Skah S, Uchuya-Castillo J, Sirakov M, et al. The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/beta-catenin pathway: An intriguing liaison. *Dev Biol* 2017;422:71-82.
21. Kress E, Skah S, Sirakov M, et al. Cooperation between the thyroid hormone receptor TRalpha1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 2010;138:1863-74.
22. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116:2627-34.
23. Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, et al. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol Cell Biol* 2001;21:4748-60.
24. Fodde R, Edelmann W, Yang K, et al. A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8969-73.
25. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdottir H, et al. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 2015;1:417-425.
26. Reich M, Liefeld T, Gould J, et al. GenePattern 2.0. *Nat Genet* 2006;38:500-1.
27. RCoreTeam. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing 2014.
28. Caro I, Boulenc X, Rousset M, et al. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *Int J Pharm* 1995;116: 147–158.
29. Aznar N, Midde KK, Dunkel Y, et al. Daple is a novel non-receptor GEF required for trimeric G protein activation in Wnt signaling. *Elife* 2015;4:e07091.
30. Gayet J, Zhou XP, Duval A, et al. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2001;20:5025-32.
31. Marisa L, de Reynies A, Duval A, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 2013;10:e1001453.
32. Frau C, Godart M, Plateroti M. Thyroid hormone regulation of intestinal epithelial stem cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 2017.
33. Shi YB, Ishizuya-Oka A. Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling: implications from molecular analysis of amphibian metamorphosis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;65:53-100.
34. Tata JR. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 2006;246:10-20.
35. Kress E, Rezza A, Nadjar J, et al. The thyroid hormone receptor-alpha (TRalpha) gene encoding TRalpha1 controls deoxyribonucleic acid damage-induced tissue repair. *Mol Endocrinol* 2008;22:47-55.
36. Inestrosa NC, Varela-Nallar L. Wnt signalling in neuronal differentiation and development. *Cell Tissue Res* 2015;359:215-23.
37. Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal* 2014;26:570-9.
38. Zhong Z, Ethen NJ, Williams BO. WNT signaling in bone development and homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2014;3:489-500.
39. Beildeck ME, Gelmann EP, Byers SW. Cross-regulation of signaling pathways: an example of nuclear hormone receptors and the canonical Wnt pathway. *Exp Cell Res* 2010;316:1763-72.
40. Kim HY, Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. *Bone Res* 2013;1:146-61.

41. D'Errico I, Moschetta A. Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1523-43.
42. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, et al. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 2005;26:898-915.
43. Sirakov M, Kress E, Nadjar J, et al. Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? *Cell Mol Life Sci* 2014;71:2897-907.
44. Clevers H, Battle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:2-5.
45. Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis* 2014;5:e1246.
46. Wang N, Wang Z, Wang Y, et al. Dietary compound isoliquiritigenin prevents mammary carcinogenesis by inhibiting breast cancer stem cells through WIF1 demethylation. *Oncotarget* 2015;6:9854-76.
47. Xu JH, Yang HP, Zhou XD, et al. Role of Wnt Inhibitory Factor-1 in Inhibition of Bisdemethoxycurcumin Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Highly Metastatic Lung Cancer 95D Cells. *Chin Med J (Engl)* 2015;128:1376-83.
48. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 2005;24:7946-52.
49. Patai AV, Valcz G, Hollosi P, et al. Comprehensive DNA Methylation Analysis Reveals a Common Ten-Genes Methylation Signature in Colorectal Adenomas and Carcinomas. *PLoS One* 2015;10:e0133836.
50. Cebrat M, Strzadala L, Kisielow P. Wnt inhibitory factor-1: a candidate for a new player in tumorigenesis of intestinal epithelial cells. *Cancer Lett* 2004;206:107-13.
51. Suzuki R, Miyamoto S, Yasui Y, et al. Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer* 2007;7:84.
52. Koyama N, Hakura A, Toritsuka N, et al. Wif1 and Ifitm3 gene expression preferentially altered in the colon mucosa of benzo[a]pyrene pre-treated mice following exposure to dextran sulfate sodium. *Chem Biol Interact* 2015;240:164-70.
53. Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn* 2010;239:56-68.
54. Galamb O, Kalmar A, Peterfia B, et al. Aberrant DNA methylation of WNT pathway genes in the development and progression of CIMP-negative colorectal cancer. *Epigenetics* 2016;11:588-602.
55. Li JY, Han C, Zheng LL, et al. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway gene SRY-related HMG-box 17 in papillary thyroid carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2012;125:3526-31.
56. Suraweera N, Robinson J, Volikos E, et al. Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. *Int J Cancer* 2006;119:1837-42.
57. Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, et al. Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2007;27:7802-15.
58. Ye YW, Wu JH, Wang CM, et al. Sox17 regulates proliferation and cell cycle during gastric cancer progression. *Cancer Lett* 2011;307:124-31.
59. Fu DY, Tan HS, Wei JL, et al. Decreased expression of SOX17 is associated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol* 2015;36:8025-34.

60. Lu J, Zhang G, Cheng Y, et al. Reduced expression of SRY-box containing gene 17 correlates with an unfavorable melanoma patient survival. *Oncol Rep* 2014;32:2571-9.
61. Li Y, Lv Z, He G, et al. The SOX17/miR-371-5p/SOX2 axis inhibits EMT, stem cell properties and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6:9099-112.
62. Yan KS, Janda CY, Chang J, et al. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5⁺ intestinal stem-cell self-renewal. *Nature* 2017;545:238-242.
63. Bond CE, McKeone DM, Kalimutho M, et al. RNF43 and ZNRF3 are commonly altered in serrated pathway colorectal tumorigenesis. *Oncotarget* 2016;7:70589-70600.
64. Katoh M, Katoh M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *Int J Mol Med* 2017;40:587-606.
65. Yu N, Zhu H, Tao Y, et al. Association between prognostic survival of human colorectal carcinoma and ZNRF3 expression. *Onco Targets Ther* 2016;9:6679-6687.
66. Wu C, Qiu S, Lu L, et al. RSPO2-LGR5 signaling has tumour-suppressive activity in colorectal cancer. *Nat Commun* 2014;5:3149.
67. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007;449:1003-7.
68. Espersen ML, Olsen J, Linnemann D, et al. Clinical implications of intestinal stem cell markers in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2015;14:63-71.
69. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
70. Brown AR, Simmen RC, Simmen FA. The role of thyroid hormone signaling in the prevention of digestive system cancers. *Int J Mol Sci* 2013;14:16240-57.
71. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-892.
72. Martinez P, Kimberley C, BirkBak NJ, et al. Quantification of within-sample genetic heterogeneity from SNP-array data. *Sci Rep* 2017;7:3248.
73. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805:105-17.
74. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, et al. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 2009;138:822-9.
75. Park SY, Gonen M, Kim HJ, et al. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J Clin Invest* 2010;120:636-44.

Figure Legends

Figure 1. Ingenuity Pathway Analysis Gene network. Molecular relationships between transcripts in the identified network "Cellular growth, Cell proliferation and Cancer" by Ingenuity Pathway Analysis. Genes or gene products are represented as nodes and connections between genes are supported by information in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. The color indicates up-regulation (red) or down-regulation (green). Different shapes of nodes represent different functional classes of gene products as indicated in the legend (right panel).

Figure 2. Inverse correlation between TR α 1 and Wif1. (A, B) Analysis of TR α 1 mRNA expression (A) and *Wif1* mRNA expression (B) in healthy mucosae (H) and tumors (T) from animals of indicated genotype. The number of samples analyzed are indicated in the X axes. Boxplots illustrate the distribution of data and the mean (black thick line). Note that *Wif1* mRNA expression is down regulated in *vil*-TR α 1/Apc compared to Apc tumors, thus validating the microarray data. \$: P<0.05 and \$\$: P<0.01, compared with tumor of the same genotype; €: P<0.05 and €€: P<0.01, compared with Apc tumors by the unpaired Student's T-test. (C, D) Immunolabelling of intestinal tumor sections from Apc (C) and *vil*-TR α 1/Apc mice (D). The images, which are representative of at least three tumors per genotype, show nuclear staining (blue), specific staining (red or green) and merged pictures as indicated. In tumors from Apc mice TR α 1 is heterogeneously expressed and WIF1 essentially expressed in areas showing a weak TR α 1 staining. Bars, C 10 μ m; D, 5 μ m.

Figure 3. Chromatin occupancy of TR α 1 on the *Wif1*-TRE. ChIP analysis was performed with chromatin isolated from freshly prepared intestinal epithelial cells from WT mice and immunoprecipitated with anti-TR α 1, anti-GFP or rabbit IgG (negative control). qPCR was

performed using specific primers covering the *Wif1*-TRE and the *Sfrp2*-TRE or the *Ctnnb1*-TRE (positive controls). Non-specific enrichment of TR α 1 was evaluated on a region of the *Wif1* gene located 3Kb upstream the TRE (*Wif1*-3Kb) and on the *Rplp0* (36B4) promoter (negative controls); the *Ppia* gene was used as an internal control. Histograms represent mean \pm SD, N=3, of the specific DNA enrichment in each sample immunoprecipitated with the indicated antibody and are expressed as percentages of the starting inputs.

Figure 4. TR α 1 enhances β -catenin/TCF4 activity in colorectal cancer cells. (A, B) Generation of TR α 1-depleted Caco2 cell lines. The knock-down efficiency was assessed by comparing TR α 1 mRNA by RTqPCR (A) or protein by IB (B). Two independent shRNA sequences targeting TR α 1 (efficiency ~80%) and a scrambled-Sh (Sc-Sh) were used in all the experiments. Histograms represent mean \pm SD (N=6) from one out of three independent experiments. *: P<0.05 compared with Sh-scr, by Student's T-test. (C, D) Depletion of TR α 1 decreases canonical Wnt signalling activity. Bar graphs display quantification of luciferase activity in Caco2 cell lines generated in A after transfection with the TopFlash vector (C) or the negative control FopFlash vector (D) to monitor Wnt activity by using the Dual-Luciferase Reporter Assay System. Caco2 cells were maintained in culture medium containing physiological concentrations of T3 in the absence (Ctrl) or in presence of co-transfected β -catenin/Tcf4 complex. Histograms represent mean \pm SD (N=6) from one out of three independent experiments. **: P<0.01 compared with control condition of the same cell line; \$\$: P<0.01 compared with the β -catenin/TCF condition of the Sh-scr cells.

Figure 5. TR α 1-dependent cell growth and migration in colorectal cancer cells. (A) Depletion of TR α 1 inhibits cell proliferation. Caco2 cell lines were analyzed for their ability to proliferate during 70h in culture medium supplemented with 10% FBS. Cell proliferation

was monitored and quantified as detailed in ‘Materials and methods’. Confluence index (y axis) in cell lines are displayed as curve graphs. Depletion of TR α 1 significantly delays cell proliferation. Histograms represent mean \pm SEM (N=10) from one out of three independent experiments. **(B)** Depletion of TR α 1 inhibits anchorage-dependent cell growth. TR α 1-depleted Caco2 cells were analyzed for their ability to form adherent colonies on plastic plates during 2 weeks prior to fixation and staining with crystal violet. The upper panel shows photograph of the crystal violet-stained 6-well plates. The number of colonies was counted by ImageJ (Colony counter) and plot graphs (lower panel) display the size (area) of colony formed (y axis) for each cell line. **(C, D)** Depletion of TR α 1 inhibits 2-D cell migration. Confluent monolayers of Caco2 cells were scratch-wounded and incubated for 70 hr in culture medium in absence of FBS. Wound closure was monitored and quantified as detailed in ‘Materials and methods’. In panel **C**, confluence index (y axis) in cell lines are displayed as bar graphs. Note that depletion of TR α 1 significantly delays wound closure. Histograms represent mean \pm SEM (N=10) from one out of three independent experiments, each conducted in 10 replicates. Panel **D** shows representative pictures of different cell lines taken at T0 or T70. ***: P<0.001 and ****: P<0.0001 by Student’s T-test. *** in A and C applies to each time-point.

Figure 6. The correlation between TR α 1 and Wnt is present in human colorectal cancer from patients. (A) Positive correlation between *THRA* expression and Wnt signaling pathway in human CRC. *THRA* expression values and the Wnt/ β -catenin signaling enrichment were analyzed in CRC using the TGCA (The Cancer Genome Atlas) dataset. The graph shows a highly significant (P-value, 7.2×10^{-32}) direct correlation between *THRA* expression levels and Wnt activity. **(B)** *THRA* gene expression in the six molecular groups defined by Marisa et al.³¹. Note the dispersed expression of *THRA* in the different groups compared with the healthy

mucosae (NT). Statistical analysis revealed that *THRA* is significantly up-regulated in four out of the six groups, as indicated. * <0.05 and **: $P<0.01$, compared with normal tissue by Student's T-test. **(C)** Immunohistochemical analysis of TR α 1 expression in healthy mucosa and in cancer. TR α 1 appears clearly expressed in nuclei of some epithelial cells in cancer but is not-detectable in normal tissue. Bar, 5 μ m. **(D)** Analysis of TR α 1 mRNA expression in cohorts of tumors. Histograms display TR α 1 mRNA expression in each tumor represented as fold change relative to the healthy mucosa of the same patient (expression value in healthy mucosa=1). The red line delimitates over- or unchanged/low-TR α 1 expressing tumors; the dotted black line distinguishes the two cohorts analyzed. Panel **E** shows the relative mRNA expression of TR α 1 and *WIFI* in each tumor, expressed as fold change relative to the healthy mucosa of the same patient. The thick black lanes indicate means. Red or black dots show expression values of high or unchanged/low TR α 1 expressing-tumors respectively. *WIFI* mRNA expression is represented by red and black squares, corresponding respectively to high- or low-TR α 1 expressing tumors. Note that most of the red squares are located well above the black dotted line, which define tumors with unchanged expression levels.

Supplementary Figure and Table Legends

Figure S1. Generation of a list of differentially expressed genes. Venn Diagram representing the 3839 differentially expressed genes obtained by performing the T-test (left), the 4305 differentially expressed genes obtained with the ANOVA test (right) and the 2981 common genes. For further studies we focused specifically on the common list.

Figure S2. Hierarchical clustering. Hierarchical Clustering enabled to observe the relations between the tumors of different genotype and to visualize the differentially expressed genes. In this clustering, the 2981 transcripts were grouped in two dendrogram each of which represents a genotype. Each line is a probe and each column is an RNA sample hybridized on an array slide. Expression signal intensities are shown in red and green, indicating high and low expression respectively. Dotted lines delineate each individual sample; adenocarcinoma samples of different genotype are separated by the thick line.

Figure S3. Gene ontology analysis for significantly changed transcripts by Ingenuity Pathway Analysis. (A) Bar chart illustrating Biological Functions associated with the differentially expressed genes. (B) Table summarizing the top 3 functions, their statistical significance and the number of genes present in each category.

Figure S4. Gene ontology analysis for significantly changed transcripts by Ingenuity Pathway Analysis. Bar chart of the most significant canonical pathways associated with the differentially expressed genes.

Figure S5. Localization of the putative TR α 1-binding sites on the murine *Wif1*

promoter. (A) A 5 Kb region upstream of the *Wif1* start site was analyzed using NUBISCAN software, revealing one putative binding sites. The sequence highlighted in bold (yellow background) shows the arrangement of the two half-sites as a typical DR4. The first exon is in red, and the first coding ATG is in bold in a yellow background. **(B)** Results obtained by NUBISCAN summarizing the score, the P-value and the sequence of the putative DR4.

Figure S6. Molecular analysis of the Thyroid hormone Responsive Element present in the *Wif1* gene, by *in vivo* Chromatin immunoprecipitation. Study by qPCR of the DNA purified from the different samples before and after ChIP visualized on agarose gel. The picture is representative of two independent experiments. Indicated on the right part of each panel is the fragment of *Wif1* gene amplified. S: pre-immune serum; TR α 1: anti-TR α 1; GFP: anti-GFP; SI: starting input; Ctrl PCR: negative control for PCR mix.

Figure S7. Increased expression of TR α 1 hyper-activates canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway and potentiates cell proliferation. (A, B) Generation of stably overexpressing TR α 1 Caco2 cell line. The overexpression efficiency was assessed by comparing TR α 1 mRNA by RTqPCR **(A)** or protein by IB **(B)**. **: P<0.01 compared with control condition (Ctrl) by Student's T-test. **(C, D)** Increased TR α 1 expression potentiates canonical Wnt signalling activity. Bar graphs display quantification of luciferase activity in Caco2 cell lines generated in **A** after transfection with a TopFlash vector **(C)** or the negative control FopFlash vector **(D)** to monitor Wnt activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System. Caco2 cells were maintained in culture medium containing physiological concentrations of T3 in the absence (Ctrl) or in presence of co-transfected β -catenin/Tcf4 complex. Histograms represent mean \pm SD (N=6) from one out of three independent experiments. **: P<0.01 and ***: P<0.001 compared with the control condition of the same

cell line; \$\$: P<0.01 compared with the β -catenin/TCF4 condition of the control cells. **(E)** Increased expression of TR α 1 potentiates anchorage-dependent cell growth. Caco2 cells generated in **A** were analyzed for their ability to form adherent colonies on plastic plates during 2 weeks prior to fixation and staining with crystal violet. In the upper panel, photograph of the crystal violet-stained 6-well plate is displayed. The number of colonies was counted by ImageJ (Colony counter) and the lower panel shows plots displaying the size (area) of colony formed (y axis) for each cell line. ***: P<0.001 compared with control cell line by Student's T-test.

Figure S8. Analysis of *WIFI* mRNA expression in CRC patients. **(A)** Analysis of *WIFI* mRNA expression in cohorts of tumors. Histograms display *WIFI* mRNA expression in each tumor represented as fold change relative to the healthy mucosa of the same patient (expression value in healthy mucosa=1). The red line delimitates over- or unchanged/low-*WIFI* expressing tumors; the dotted black line distinguishes the two cohorts analyzed. **(B)** *WIFI* mRNA expression values in TGCA (The Cancer Genome Atlas) dataset. Boxplots illustrate the distribution of data and the mean (black thick line). Note that *WIFI* is significantly down-regulation in CRC, as indicated.

Figure S9. Localization of the putative TR α 1-binding sites on the human *WIFI* promoter. **(A)** A 5 Kb region upstream of the *WIFI* start site was analyzed using NUBISCAN software, revealing one putative binding sites. The sequence highlighted in bold show the arrangement of the two half-sites as a typical DR4. The first exon is in red, and the first coding ATG (in bold) is underlined. **(B)** Results obtained by NUBISCAN summarizing the score, the P-value and the sequence of the putative DR4.

Supplementary Tables

Table S1. Oligonucleotides used for different approaches.

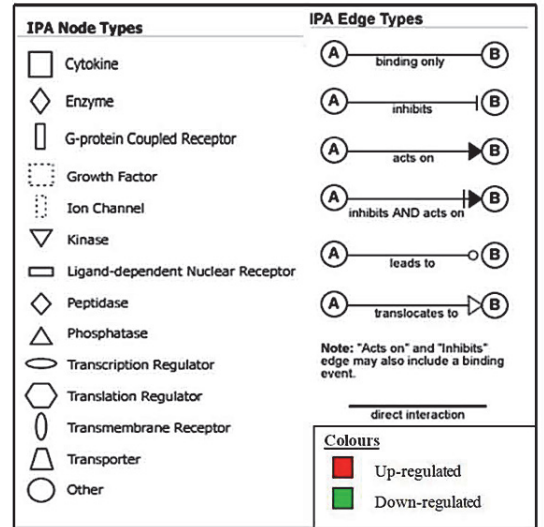
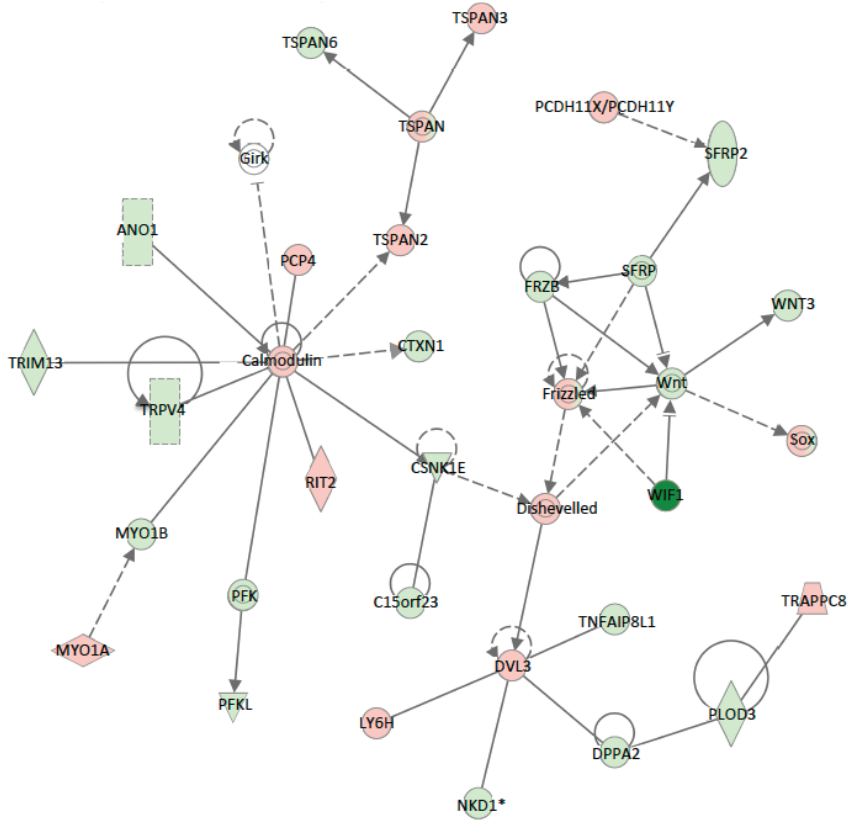
Table S2. Differentially expressed genes between *vil*-TR α 1/Apc and Apc adenocarcinomas.

Table S3. Differentially expressed genes present within the network "Cellular growth, Cell proliferation and Cancer".

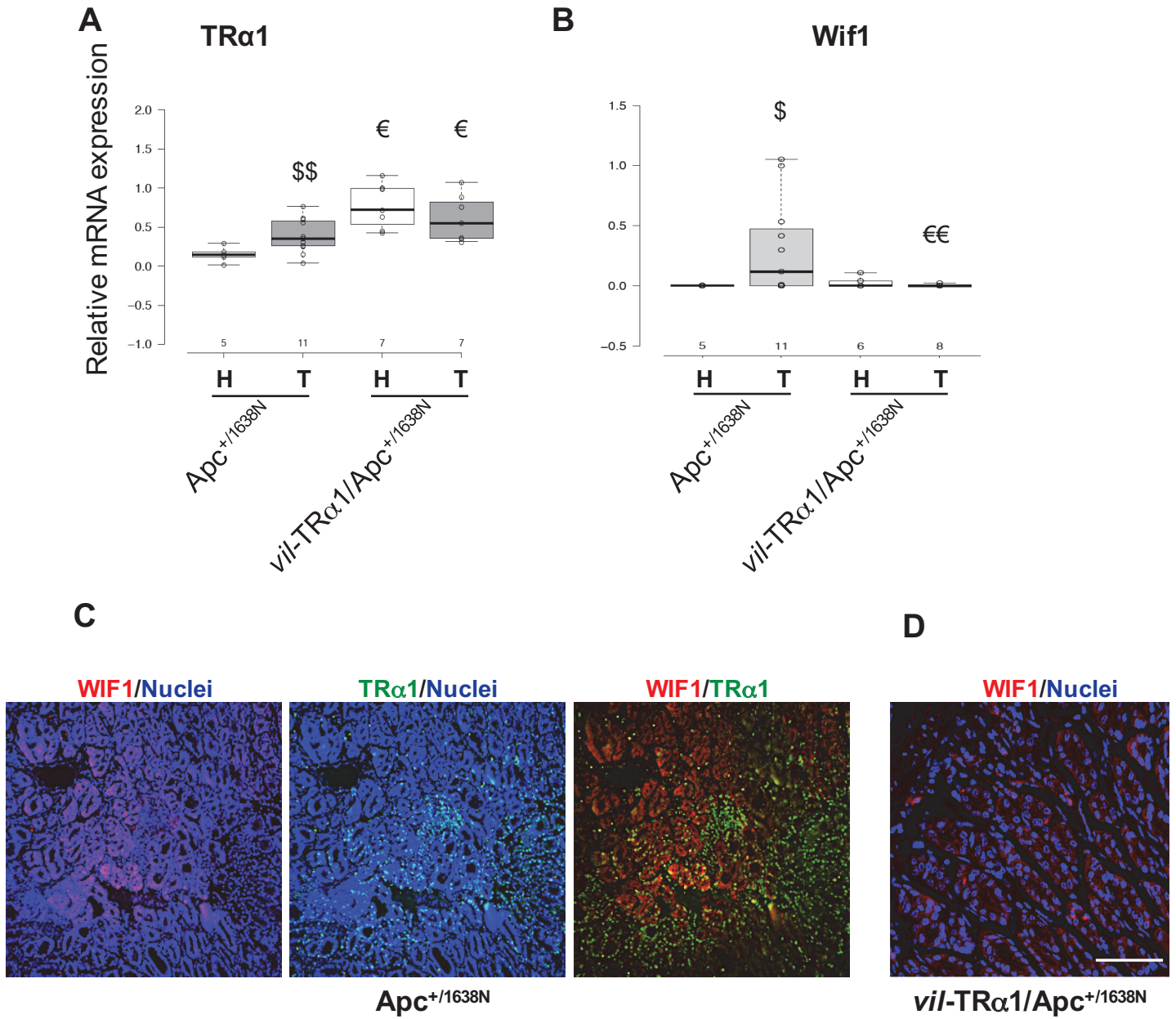
Table S4. Analysis of differentially expressed genes by RTqPCR.

Table S5. Analysis of tumors in TR α ^{0/0}/Apc *versus* Apc animals.

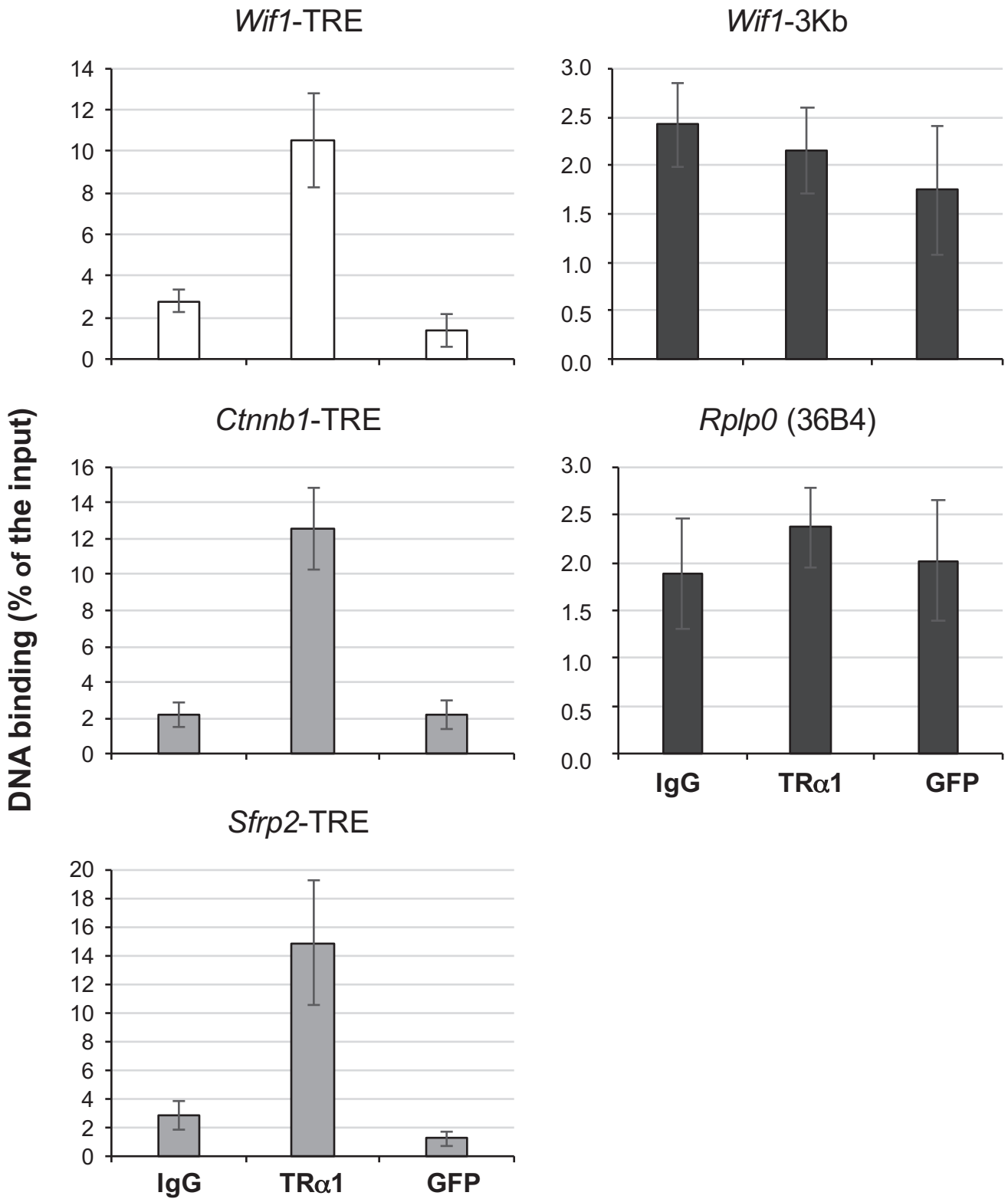
Uchuya et al, Figure 1



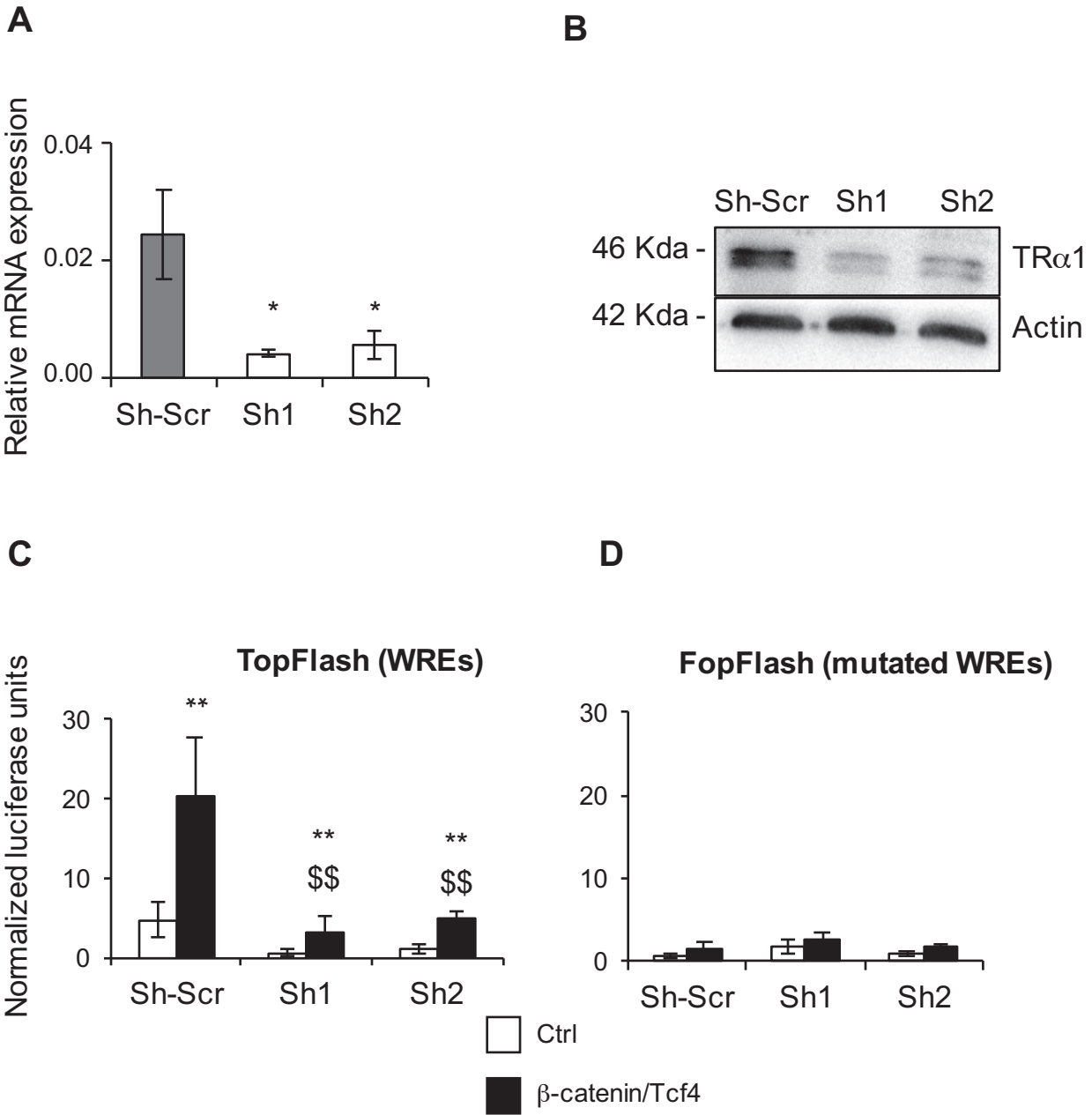
Uchuya et al, Figure 2



Uchuya et al, Figure 3

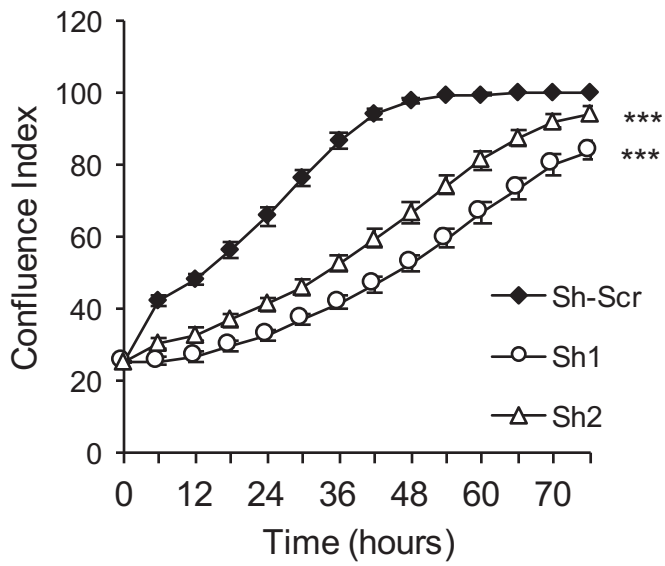


Uchuya et al, Figure 4

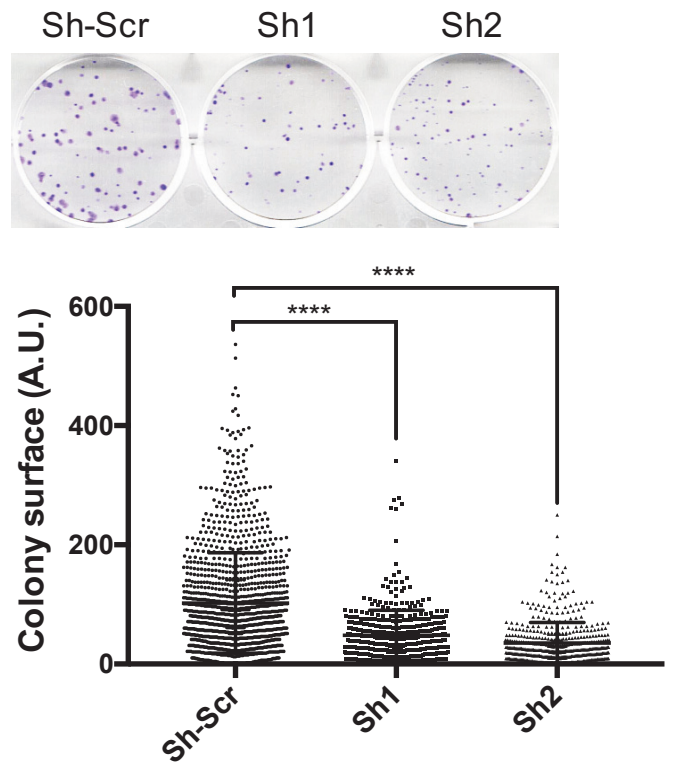


Uchuya et al, Figure 5

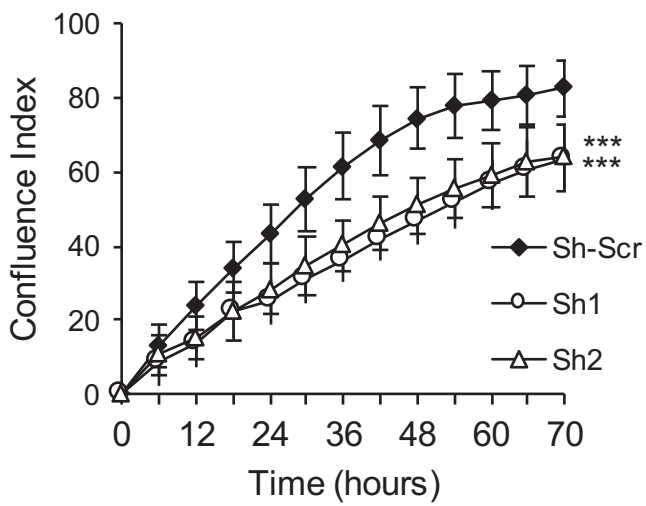
A



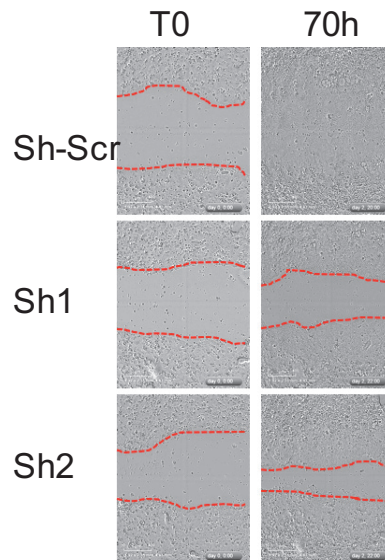
B



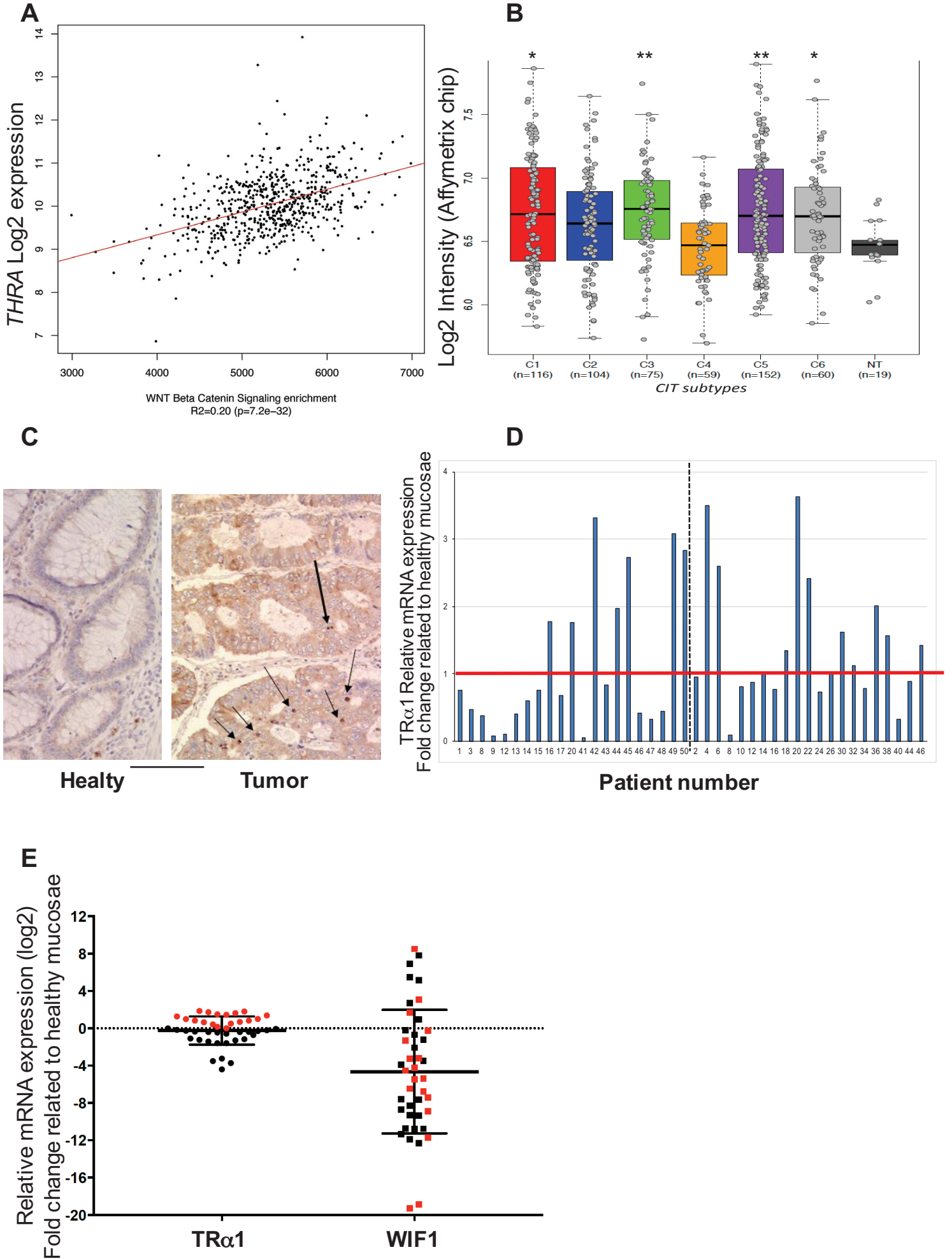
C



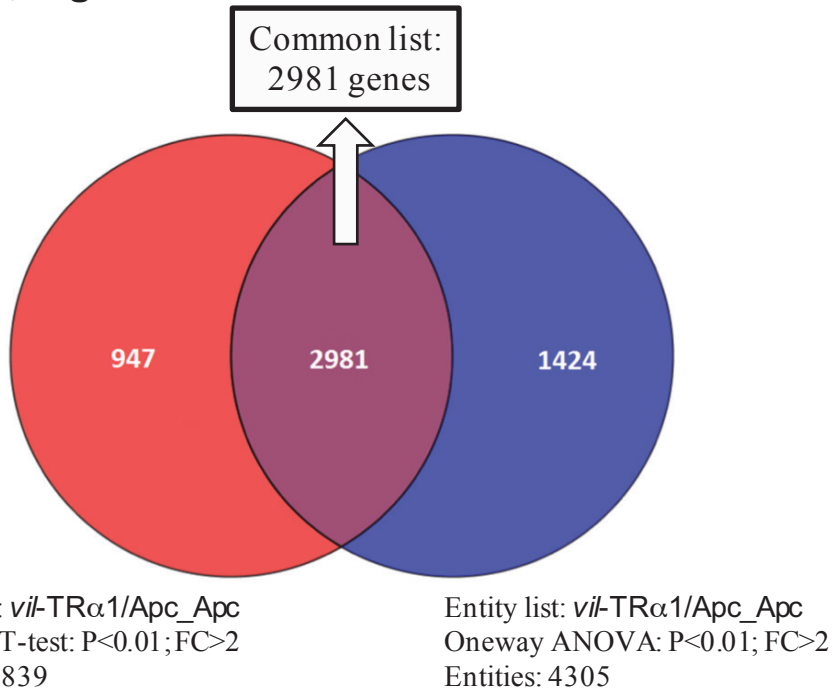
D



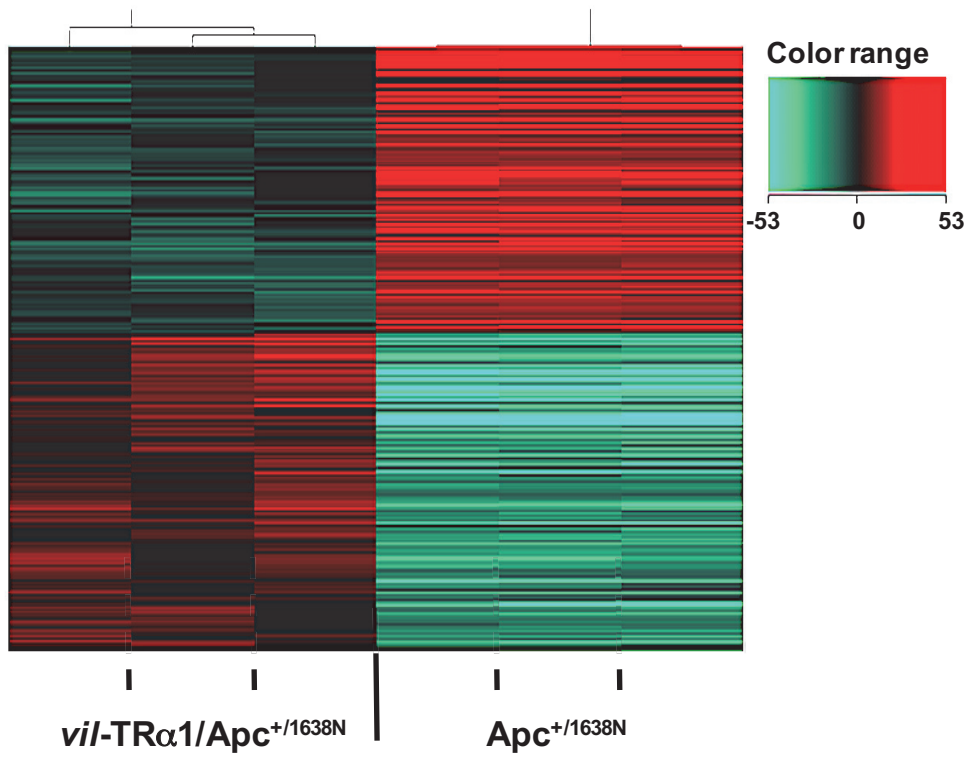
Uchuya et al, Figure 6



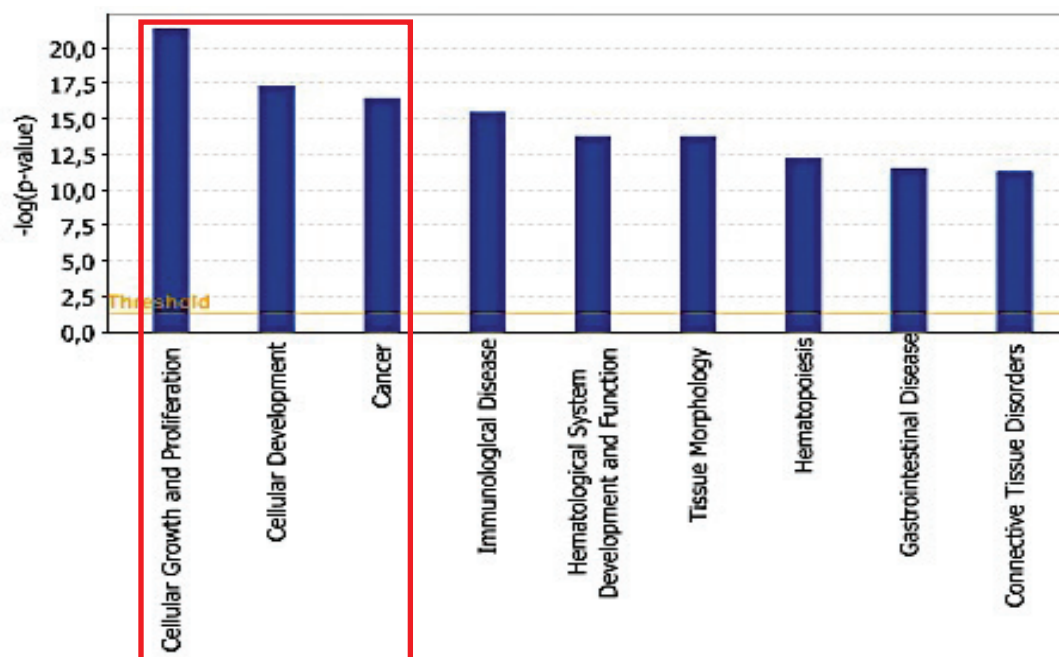
Uchuya et al, Figure S1



Uchuya et al, Figure S2

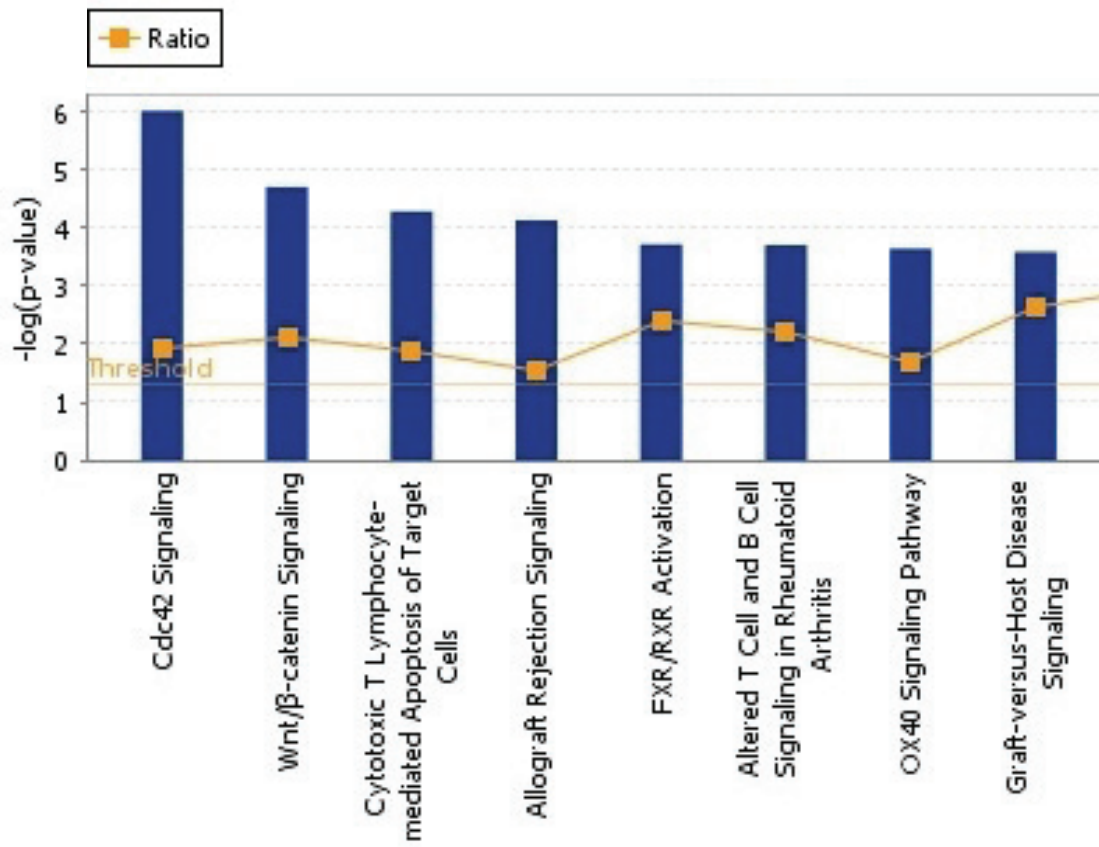


Uchuya et al, Figure S3



Category	Functions Annotation	P-value	Genes
Cellular Growth and Proliferation	Proliferation of cells	4.35E-22	423
Cellular Development	Differentiation	4.51E-18	316
Cancer	Tumorigenesis	3.36E-17	558

Uchuya et al, Figure S4



Uchuya et al, Figure S5

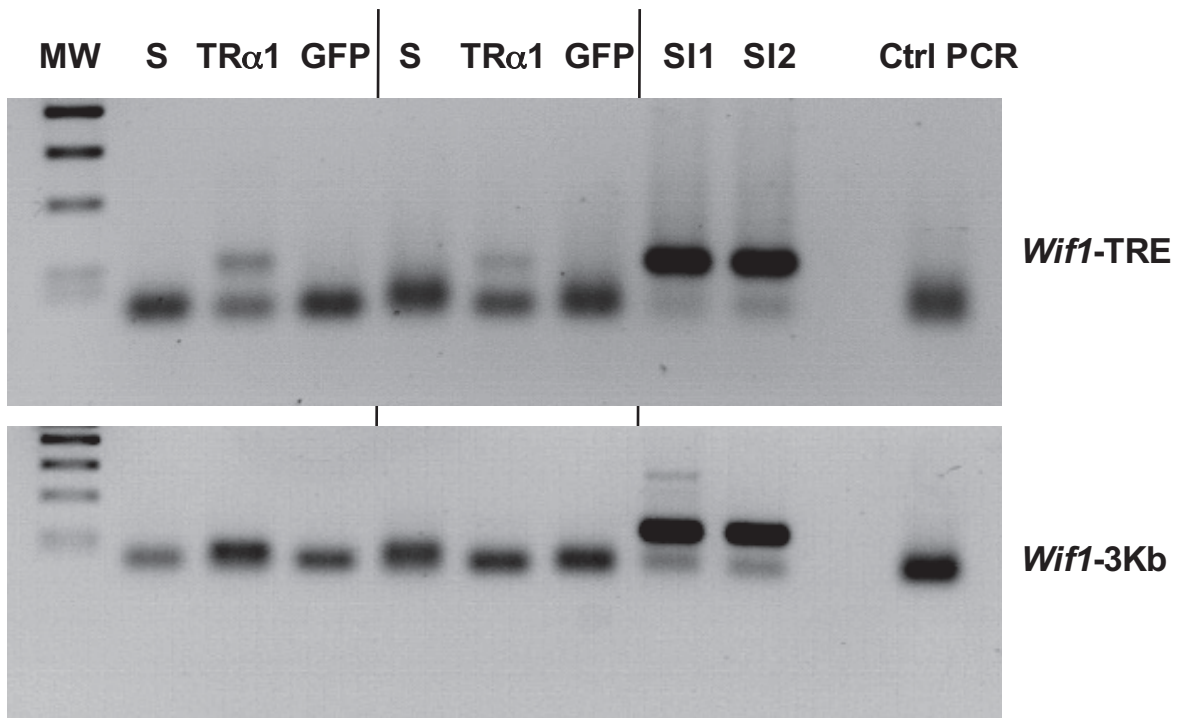
A

AATGCTGTAATGCTGTGAAAAAATGCTCAGAATTTTAGCTGCCAGATTTCTCTTTGAACTTCTGTCAAAGTTGCTGTACTCTGCTTTATATCAGGGTTGTGAGGC
 GCTTGTGCTCCTTAGCGAGCCTGGTGTCTGAGGGGCTCAAGTTCGTGTCTTTTCTTGGCTTT**AGGTCAgTgCTGGGCA**TTTCAGTAAATCTTATGGAATGAGTGAA
 TAAATTAATAGACAGATGAATGAGGCTAGAAAACACAGTGGTCTGGCTGAATCACACAAGGAAGGAAGCATTCTGGGTAGACAATGTATGGGAGAATTTCTCAAAGCA
 AACACAACAACCTCTAACACACTGTAGCCAAATCATGCATGCGACTATATTTTATAGAAAATTTTAAAGCATACCTATCTAAATGAATAAATCTATTTAAAAAG
 GGGGATAAAAAATTCAGTTCTTGGATAGATTTCTATAGAGATACGCTCTATTACTGTTAAGTATCTGACCTGCCTACACAAGCATGTTTCTCCCCCTTAAAAACC
 AAGTTATTCACAACACAGACTTCTTTAAGCAGGATTTTGTCTTTGTAGTCAACTAGCCATTTAGGCGTCAGAGGACTGAAATTACAAGATGTCACGTGCCACCACAGC
 TGGCTTAAATTTAGGTGTGAGTGAGTGTGTGTGTGTGTGACTGCATATGTGAGTGTGATGAGTACTGTATATGTGAATGTATGTGAGTGTATGTAATGTGTGT
 GTGAGTGTGATGTGAGTGAATGTGATGGGATGTTGGGTGTGGGGAGTGTGATTTGTGAAGCATGTTTGTGTGAGATTTTGTGTTATGAGTGTGTGAGGTATGTAT
 ATATGTGTGTTGAGTGTGTGAGTGTGTTGTGTGTGTTGTGTGTGAGTGTGTATAAGTGTGTGTTGTGAGCATGTATATGTGTGAGTGTGTGTCATGCGTATATGTTGTG
 TGTGAGTGTGTCATGTTGTATATAGGGTGTGTGTTGTGAGCATGTGCACGTTGTGTGTTTTGTGTGCACACATGTGCATGTGGTGCACACAGACAGAGGGGACATC
 AGCTGTCTTGTGAATCGCTTTTCAATTACTCCCTGAGGCAGGAGTTCCTACTAACCCAGAGCTAGGCTAGCCACCAGTAAGTCCAGGCATCCTCTGTGCAGCGC
 CTCAGCATAGGGTTACAGGAGCACAAATACCTCGGACAGCTTTTATTTGTGTTGCCAGGGATATGAACCTCGTTCCTCGCGCTGTACAGTAAGGGTAAAGACTCTCA
 CCGCTTACCTCTCTAGTACCAATAAATTTTAAATAACGTTTATGTATCTCTAAAAATACAGTATGTTTTTCCCTGGAGAAAAGTGAACAGAAAAATGTAGTGT
 GGTAGTATTGGTGGTGTCTGTTGTGTGAGTGTGATGATTGATAATGATGATAAACAAGGCTACTTTTCTGTAGTCTAAGCTGGACTTGAATTCAGTGT
 AGCCTCGGCTGGCCTCATTTTCACTGAAACCCTCCTGCCTTAGCTGTGAGTGTGAGGATAACAGGCATTTGCCACACACCTAACAAAAAATTTGTCAGAAATTGGG
 GAAATTTCTTATAGCAGGATAAATGTCTGTCTCAACATCAAAGCAGCTGTCTACGAAAATCCTCAGTGGAGGAAGCTGTATTATGATAGAAATTTGTTCCCTTTC
 AGTTCTCAGCTGGCGTTTGAACAAGAACAACTGTAGAGGGCGTCTTACACAAGAGCCATGGAGGTTCTGAGCAATACTACGGAAGAAAACCTTCAACGAAAACAC
 ATTCCAAGTCAAAAAGAGTCTATTGTGTGGGAAATTTATACCTGTAACGAATGACACTGTTTTTACAATATTTAAAGGGTATAAGTTTGCCTAATATAGTAAAACA
 TTATATAAATTAATATTCAGTCAACAATAAATTAATAAAATAGAATGTTGGGAAAAGATCCTTTTTGTGTTTTGTTTTGTGTTTTGTGTTTTGTGTTTTGTTGAGACA
 GAGTCCAGGTAGCCAGGCTGGCTTCAAACCTCCATATGTGATTAACAATGAGTCTGATGCCTCCTGCCTCCTACTCTTTAGCCCCAGATTACAGCCTG
 TGCTACCACAACCAGTTTAAATGTTTTGTTTTAAAGAAAGAGTAGATGTTAAGCTTTTTGAGGCAACCGTCTAAATGTTGATTGCAAGAAGGGGCTTGAAGTTA
 GAGCGATCGTGAATTTGAATTCCTACTCTTGTCACTCACAGCTGAATATCTCGGTCAATTTACTAGACTTTTAAAGCTTTGGTCCCATCAGTAAATGAGAGTAG
 TAACAGTAGCTGCCTGAGAAGAAATTTTAAATGAAGCTTCATGGAGTTCACAGTACAATGGACAGTCTTCGTGTCTAATCCCAAACACAATACCTTCTTACCAAT
 CTGTTAGATACCTACACAGATTTACAGTTTTAAACACATGTTCT
 TCCT
 CTTGTGACCTAACATTTGTTGAACATGTACGCTCAAGTCCCGCTTCTATTTCTGTAGTCTTGTGTTTTGCCATCCCCTGTGAGAGACCCACCGCTCTACAAAGGAC
 AGAAGGGAACACAGCCAGCGCCAGAGTCTAGATCCCTGAGGGGCATTTGCTAGAAAAGCCTGGGTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAAACAAAGCTTTTCC
 GGGGCTGAAAATTTCTGTGTGTTTTGAAAACCATTTGTTTCGTCTTCTGTTACGTTCAAGGAGCAGGCAAAAAGCCTTCCGTGACAGGTAATGCTGCAAGC
 CGCCGCTAGCTAAGTGCTCTCCACCAGACCTCAGTCTTACCCTCAAGCGCTAAGATTTCCAGAGCTGGGCGTGAGCCTCCTAATGTTTTCCCCAAATCCAATTT
 TAAGGGGAGTCTACCCTCGTATAGCAGGATGGGGGAAAGGGATTACAGTATCATCGAGTCTTAGGGAATTTCCGGGTGCAACTGGGTATCAAGAAGACAA
 ACCAGCCACCTGTCCGGTGTCTGTCCAGTGCAGAAATAAATGAACGCTTCCGAGGACCAGCGCTGACAGTACCCGACTAGCCCTGTGGAGTCTCAGTATTTAACTT
 CCTAGGAGAGAGAGCGAGAGCGAAACTGTGAGTAGAAGTGTAGATTTGAGACAGGACACAGAGATGCAAGTCTGAAATGTATTCGAGAGAAAAGGGTGGG
 CTGGCTATGTGCTTTCCGTTAGCTCCACTGTAAACCGAATTTATCTTTGACCAGAACCGAGCCAGATTTTTTGTGTTGTTGTATAGCACCCCGCCATCCAC
 ACGTGTCTTCCGGGCGCAGGAGGCTGAGTGTGATGACCCAGAAGTCCCCTTGGGTTGTGTTCTTGGTGTGTCCCGTTTTCAATCACCCTGGCGCAGGCAGCGGGG
 TCTACCGGGTACCGCGCCCGCCCGCGGCTCCGACAGCTCCCTAGTGGCGACCGCTGCACACCAGCGCTCTCAGTGCTGCCTTTTGCCAGAGTTCCC
GCGGTTCCCTCCTCTCAGTGTGCTCCTCTAGCTGCTGGCGCTGTGGGACGTTGCCAGCTTTGCCAGCATCGTGTCTCTGCGTCCCCTCTCCCTCCAGC
CCCACCTCTTTCTACGCGGCGGCATCCACTCCCTCCTGTGCCCTCTCTCCAGCACTCCAGGCTCACTCGCAACGGAGACTGGAGACTGACGCCCAGTCTGT
TTAAGTAGAACAAGCTCCAGCCAGGCTGACGCAAGCGAGAATTTACAAGCAGCACAGGTTGGGTGCTGCGGAGGAGTTGACCACCAGCGAGAAGGTCC
TGAGACCATGGGCTCGGAGAGAGCCTTCCCTGCTTTGCGCTCCGGCTCTGGAGCATCTACTTGCCTGCTCCTGCTGCGAGCGGATGCAGGGCAGCCACCTGAG
 GAGAGCTGTACTGTGGATCGACGCCATCAGGCTAGAGTGTCTCATAG

B

Species	TRE	Position (strand)	Score	P-value	Site sequence
Mus musculus	DR4	-3555(+)	0.756366	0.0237602	AGGTCAgTgcTGGGCA

Uchuya et al, Figure S6



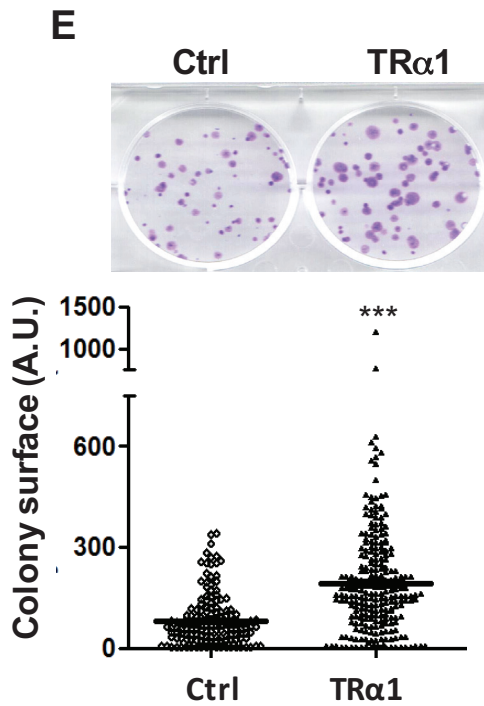
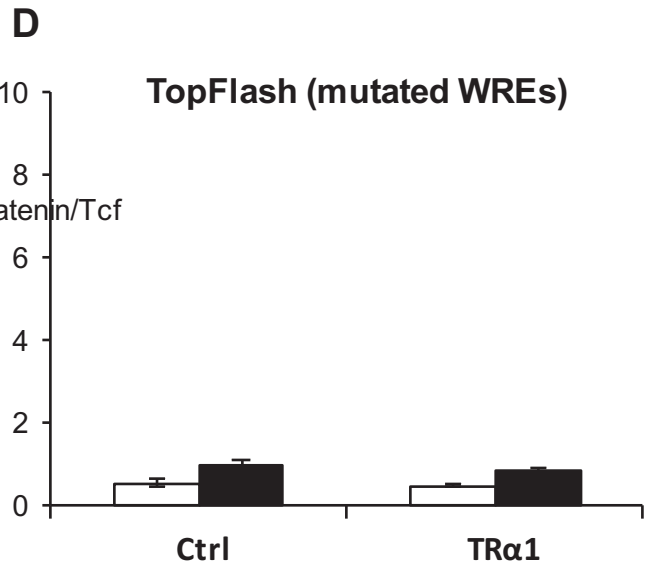
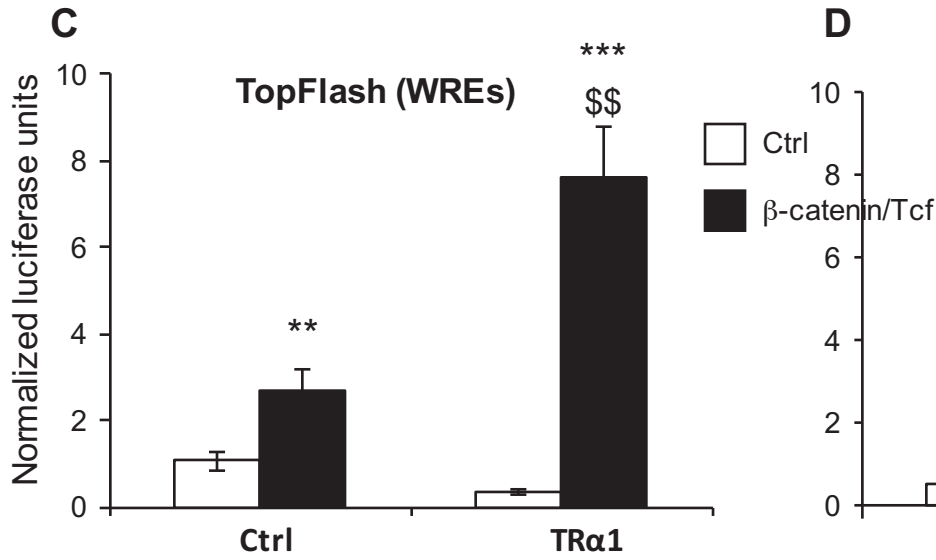
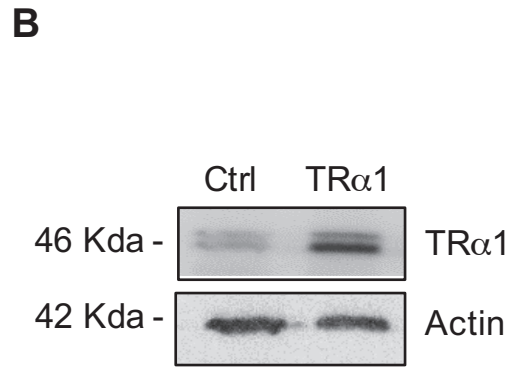
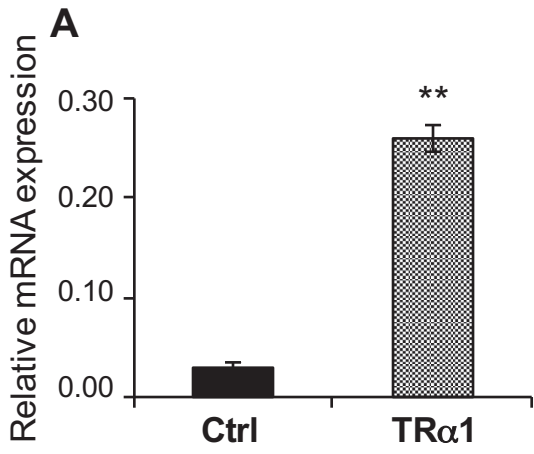
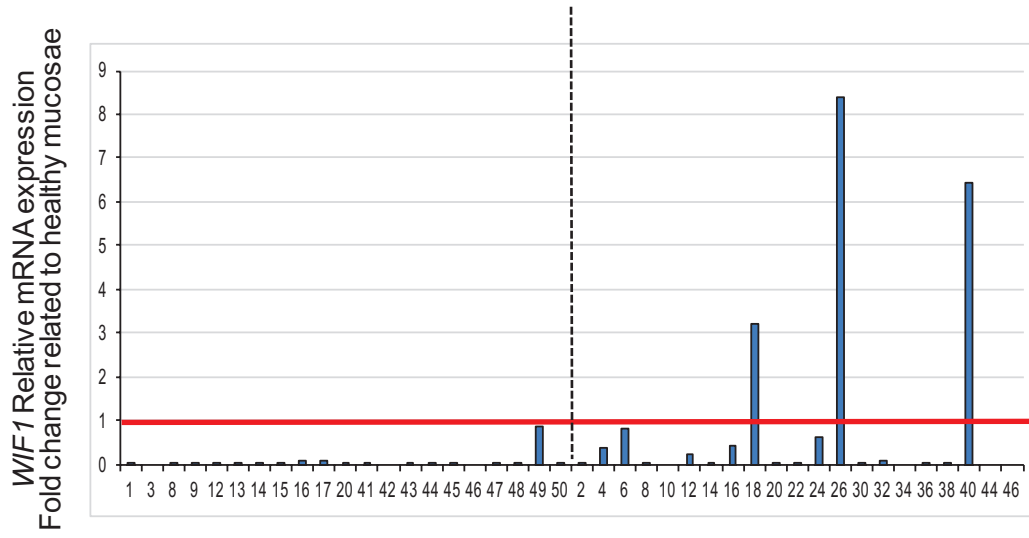


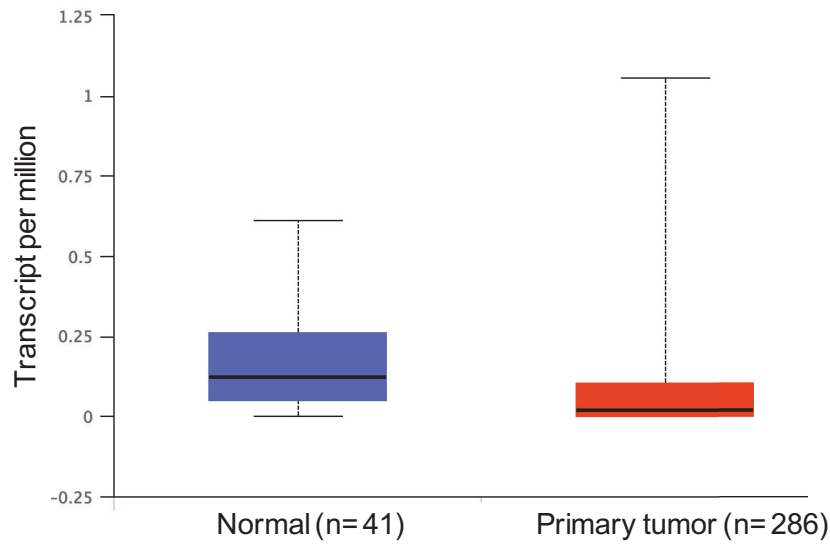
Figure S7. Increased expression of TR α 1 hyper-activates canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway and potentiates cell proliferation. (A, B) Generation of stably overexpressing TR α 1 Caco2 cell line. The overexpression efficiency was assessed by comparing TR α 1 mRNA by RTqPCR (A) or protein by IB (B). **: P<0.01 compared with control condition (Ctrl) by Student's T-test. (C, D) Increased TR α 1 expression potentiates canonical Wnt signalling activity. Bar graphs display quantification of luciferase activity in Caco2 cell lines generated in A after transfection with a TopFlash vector (C) or the negative control FopFlash vector (D) to monitor Wnt activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System. Caco2 cells were maintained in culture medium containing physiological concentrations of T3 in the absence (Ctrl) or in presence of co-transfected b-catenin/Tcf4 complex. Histograms represent mean \pm SD (N=6) from one out of three independent experiments. **: P<0.01 and ***: P<0.001 compared with the control condition of the same cell line; \$\$: P<0.01 compared with the b-catenin/Tcf condition of the control cells. (E) Increased expression of TR α 1 potentiates anchorage-dependent cell growth. Caco2 cells generated in A were analyzed for their ability to form adherent colonies on plastic plates during 2 weeks prior to fixation and staining with crystal violet. In the upper panel, photograph of the crystal violet-stained 6-well plate is displayed. The number of colonies was counted by ImageJ (Colony counter) and the lower panel shows plots displaying the size (area) of colony formed (y axis) for each cell line. ***: P<0.001 compared with control cell line by Student's T-test.

Uchuya et al, Figure S8

A



B



Comparison	Statistical significance
Normal-vs-Primary	4.0962000000332E-05

Uchuya et al, Figure S9

A

TCTGTTGTTTCTGTTTGTGTTTTCCCTCTTGAGGCATCTGCTACTCTATAAAGGACTGATTGAAACACCACGCCAGCCCCAGACATTTGATCCTTGAGGCATTTGTCA
 CAGCTTCGGGTAATAAAGAACAACACAAGTAAATGAACCTTTTATGAGTCCGAAGGCTAAGTTTTTAAATTAATAAACAACAAAACAAAACCCCTTTGCTTCCGTT
 TTCTTTGTGCATCCGAGGAATTAGGCAGGAGGCAAAAATCAGTTCTTTCTGCTGGGCCAGGTGGATAGGTTATGCTGCAGCCCACTGCCGGCCAAGCATGCTTCTCAC
 AGACGAGGCCAGAGCCTTGGTTTTGCCCCACGCACCTGTGAATTCGGCAACTTTTAAAAAATTTATTTATTTATTTATATATTTTTTTGAGACGGAGTCTCGTC
 CTATCGCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGCACGATCTTGGCTTAATGCAAACCTCCGCTCCCGGTTCAAGTGATTCCTCGCTCAGCCTCCGGGTAGCTAGGACTACAG
 GCCCCGCCACCATGCCAGCTAATTTTTGCATTTTTAGTAGAGACGGGTTTACCACGCTGGCCAAGCTGGTCTCGAACTCC**TGACCTCAGGTGATCC**GCCC
 GCCTTGGCTCCCAAAGTGCAGGGATTACAGGCGTGAGCCATCGCGCCCGGCCGAATTCAGCAACTTTTAAAAAATATCAGCAAACGTGAAGATATCCACGATGTTAG
 AGGAGCCCTACCCCGGAGGGTCAGGTACAGTATCGTCCAGGGCCAGGGCACTCTCCGGGCACTGCCGGGTTATCAGGGAGACAGACGGGAATCCCAAATGCTGG
 GTGTCGGGCAAGTACCAGCTGGACGCCCTGCGCTCGAGCCAAGGCCAGGCCCTGCCATCGGCACCATCGGACAGTGCAGCCTCGAGTTTTAACTGCTTGGGAGCGCG
 CAAAGTGCCAGCCTATCGCAGAACGGAGCGCATAGGGTTGGCGGAGAGAGGAATCCTACTGGCTGAAAGGGAGACGAAGGGCAATTTGCGCCTTCAGTGAGCGCCGGA
 GGAGGAACAGGAGTCAACCTCATCATCATCATCATCATCACCATCACCATCACCATCAGCACTCAGTCAAGCCAGCGTGTGCTGCTCTCCCATT
 CCTCCCCGAAGCCTCCCTTGGCCCCGAGGAGTGGCGAGTGATGTCCAGGGGTCTCTGAGTGCCCTTCTCCGGTCCGCCAGCCCTACACGCCCACTTCGCGGGCG
 CTCCACTGGGCGCACCCGACTGTGAATGCAGCCTCGGGGGTCCCTCGCGGCCCGCCCCGGGGGGGCCCCACAGCGCCCCAAGTGGCGGGCCGCCCCAGGCCCTCGCGG
GCCCCACTCTCGCTCGCACCTCGCTCGCGCCAGCCCTTCCCGCTCTTCTGTTCTCGCTCTATTTGCCCGCTGACTGCTGGCCTCGCCAGCTTTGCCAGTCTTACGT
CTCTGCCGCCCCACTCCCGCCCGCGCCCATCTTCTTGGCGACTCGCGCCCGCTGGTCCCCCTCTCCTCCCGCTCCTGCTGCCCCCTCTCTGCTCTCGC
AGGCTCCTTGGCACCCAGGCGGGAGGCGACGCGCCAGCCGCTAAACGGGAACAGCCCTGGCTGAGGGAGCTGCAGCGCAGCAGAGTATCTGACGGCGCCAGGTTG
CGTAGGTGCCGCACGAGGAGTTTTCCCGCAGCGAGGAGTCTGAGCAGCATGGCCCCGAGGAGCGCCTTCCTTCCCGCCGCGCTCTGGCTCTGGAGCATCTCCT
GTGCTTGGCTGGCACTCGGGGCGAGGCCGGGCGCCGAGGAGGAGCCTGTACCTATGGATCGATGCTCACCAGGCAAGAGTACTCATAG

B

Species	TRE	Position (strand)	Score	P-value	Site sequence
Homo sapiens	DR4	-760(-)	0.771606	0.0280176	GGATCAcctgAGGTCA

Uchuya et al, Table S1

Primers used for RT-qPCR				Primers used for qPCR after ChIP assay			
Gene symbol	Primers	Sequence	Remarks	DNA detected	Primers	Sequence	Product length
Acr1c	Forward	TAAACAACGGAAAGAGCAG	Mouse	Wt1 (TBE)	Forward	TAAACAACGGAAAGAGCAG	100
	Reverse	CTGHBAGAGCACTGGGHTT		Wt1 (TBE)	Reverse	CTGHBAGAGCACTGGGHTT	
Acr2b	Forward	ATGACC TACCCTCTCTACTCTT	Mouse	Negative Control	Forward	ATGACC TACCCTCTCTACTCTT	100
	Reverse	CTTCCCTTGCTTCACTTCTT		Negative Control	Reverse	CTTCCCTTGCTTCACTTCTT	
Altda	Forward	CTGCTACGGTGGTAGAGGAGC	Mouse	Wt1-l (TBE)	Forward	CTGCTACGGTGGTAGAGGAGC	216
	Reverse	AGGCTAGGAAACAACATTTCCA		Wt1-l (TBE)	Reverse	AGGCTAGGAAACAACATTTCCA	
Anxa10	Forward	AGGATTTCAKCGCCAGAGAT	Mouse	HP2 (TBE)	Forward	AGGATTTCAKCGCCAGAGAT	104
	Reverse	CTCA TAGTGGCCCTGAAGCAAA		HP2 (TBE)	Reverse	CTCA TAGTGGCCCTGAAGCAAA	
Ctn1	Forward	GCCAACTACTCTCTCTTGTC	Mouse	Phi	Forward	GCCAACTACTCTCTCTTGTC	109
	Reverse	ATGECCTTGTGTGCTGTCAG		Phi	Reverse	TGCAAMAGCTCTGAAGGAGAGCG	
Csr5	Forward	CCTAACGGAACTCTCTTG	Mouse				
	Reverse	GCTTAGTTCCTGCTGCTT					
Dkl1	Forward	CCACTGTACCCTACCAACA	Mouse				
	Reverse	TCTGTGGTAACTCTGTTCC					
Dnl3	Forward	GATTCAGCTTCACTCCAC	Mouse				
	Reverse	GTACAGCCAGTCCACAGATC					
Fzd8	Forward	GAGCGGATTTCTTATGGATT	Mouse				
	Reverse	TTAGCCCGATGAGATAGTGTG					
Fzd5	Forward	TGTTGTCACTGGGATTTCTG	Mouse				
	Reverse	CAGGCCGGTAGTCTCATAGT					
Fzd6	Forward	CTGCATCAAGCTTGCATAAG	Mouse				
	Reverse	TAGGAGGAGCAGCACTGAGTA					
Hes5	Forward	TGTTGTTGATTTAGGAAAG	Mouse				
	Reverse	GAGCTTAGGAAAGTCTCTAC					
Hsp1	Forward	GACTATGGAGTTTGGGGHTT	Mouse				
	Reverse	GTGTTGGAGATGGGAGACGAG					
Jug2	Forward	CTGGGTGGCACTCTCTTCTAC	Mouse				
	Reverse	GCAACTGAAAGGGAATGAC					
Lif	Forward	GGACACTGTGCTCACTACCTGA	Mouse				
	Reverse	TTGGGGAACTCATCTTTGG					
Mmp7	Forward	ACCTGTTTCTGCTGCTGACT	Mouse				
	Reverse	TAATTGAGCTGTGCTGACT					
Noch1	Forward	TGTTGTGCTCTTAGAAGAA	Mouse				
	Reverse	CTTTGGGAGTAGAGGTTAGG					
Noch4	Forward	ACCTTGGGTTCCTACAGTGTG	Mouse				
	Reverse	GCAGAGATGAAAGGTTGGAGTG					
Nrsf2	Forward	CAGCATCCACAGCTGATACT	Mouse				
	Reverse	TTGCCTTTCTGGTTACTCTG					
Numb	Forward	TTGTCCTACCTGCTCTAC	Mouse				
	Reverse	CCAAACAGCATTTGGCTACGATC					
Rarb	Forward	CCTTGGAAATGGATGACAGA	Mouse				
	Reverse	TAGTGGTCTGAGAGTGTTT					
Rarg	Forward	GCGCAGTACAGCAGCAACT	Mouse				
	Reverse	CAATGTGGGCTGTGAAAGC					
Pph3	Forward	CACCAATGGTGTGACAGTCTT	Mouse				
	Reverse	ATGATCTCTCACTGCTGCTT					
Scpmb3b	Forward	HCGAAACTGTACCCTCTGAC	Mouse				
	Reverse	CTCATTTGGGGTTGGCTAICT					
Smo	Forward	GCTGGAGTAGTCTGTTCTGTTG	Mouse				
	Reverse	TGAGCAGTGGAAATAGGATG					
Sox1	Forward	TTTAAGCGAAAGCCCTC	Mouse				
	Reverse	TGCGAAGGCTTAATAATAAA					
Sox4	Forward	CCACCCTCTTGTATCTC	Mouse				
	Reverse	ATGTCTCCATGAGTCAAGC					
Sox7	Forward	ATAGCTCCATGCTACTAGC	Mouse				
	Reverse	CATGTCTCCGAAAGTTCAC					
Sox9	Forward	AMGAAGAAGCACCCGATAC	Mouse				
	Reverse	GCCCTTGAAGATAGGATAG					
Sox17	Forward	GTAAAGGTGAAAGGAGGTTG	Mouse				
	Reverse	CTTTGGCCACAGCAAAAG					
Sox21	Forward	HGHTTCTTGTGGGAGTCTC	Mouse				
	Reverse	TCCCTGGTCAAGGCTTATTT					
Sre	Forward	CCAGGC TGGAGTGGTGTGTT	Mouse				
	Reverse	TGTTGCTCTAGTCTCTCAGC					
T001 Gm1090	Forward	CATCTTGGAGAACTGGCTAGA	Mouse				
	Reverse	CCAGATCCAGCCACAGAAATAG					
Trim29	Forward	AMGGACCAAGCACCAAC	Mouse				
	Reverse	TCGACAGACTCCCAAACTGG					
Wt1	Forward	ATGATTTGGCTCTGGACT	Mouse				
	Reverse	GAGCACAGGCTCTGGTAA					
Wnt3	Forward	CTGGACAGAGACTTAA	Mouse				
	Reverse	GGAGGAC TGTGACTGTCT					
PP1B	Forward	ATGATCCAGGGGGAGACTT	Human				
	Reverse	GCCGTAGTGGTTGAGTTT					
Tbal	Forward	HGCCTT TAA CCT GGA TGA GAC	Human				
	Reverse	TCCACT TTC ATG TGG AGG AAG					
Wt1f1	Forward	TGTTCAAAGCTGTCGCGA	Human				
	Reverse	GAGGC TGGCTCTGGACTTT					

Uchuya et al, Table S3

Table S3. Differentially expressed genes present within the network "Cellular growth, Cell proliferation and Cancer"

Gene symbol	Gene Name	P-value	Fold Change	Location	Family
Pcp4	Purkinje cell protein 4	9.0323704E-10	12.162	Cytoplasm	other
Rit2	Ras-like without CAAX 2	5.575777E-7	7.573	Plasma Membrane	enzyme
Ly6H	Lymphocyte antigen 6 complex, locus H	1.4889147E-7	5.568	Plasma Membrane	other
Dvl3	Dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)	1.7458719E-5	4.580	Cytoplasm	other
Myo1A	Myosin 1A	1.8318578E-5	4.229	Cytoplasm	peptidase
Tspan2	Tetraspanin 2	1.9438273E-8	2.682	Extracellular Space	other
Tspan3	Tetraspanin 3	9.76963E-4	2.232	Plasma Membrane	other
Trappe8	Trafficking protein particle complex 8	1.247536E-4	2.217	Cytoplasm	transporter
Pcdh11X/Pcdh11Y	Protocadherin 11 Y-linked	2.0737643E-5	2.179	Plasma Membrane	other
Wif1	WNT inhibitory factor 1	3.4672276E-8	-1371.41	Extracellular Space	other
Sfrp2	Secreted frizzled-related protein 2	2.767383E-4	-26.721	Plasma Membrane	transmembrane receptor
Dppa2	Developmental pluripotency associated 2	5.4807522E-8	-26.327	Unknown	other
Nkd1	Naked cuticle homolog 1 (Drosophila)	6.1196306E-7	-13.087	Unknown	other
Wnt3	Wingless-type MMTV integration site family, member 3	2.309296E-6	-10.934	Extracellular Space	other
Trpv4	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4	1.2442643E-4	-7.394	Plasma Membrane	ion channel
Tnfaip8l1	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	8.699543E-8	-6.543	Unknown	other
Pfkf1	Phosphofructokinase, liver	3.0679496E-6	-5.338	Cytoplasm	kinase
Trim13	Tripartite motif containing 13	7.840267E-4	-4.344	Cytoplasm	enzyme
Ano1	Anoctamin 1, calcium activated chloride channel	5.711523E-6	-4.073	Plasma Membrane	ion channel
FrzB	Frizzled-related protein	2.5567264E-4	-3.692	Extracellular Space	other
Ctxn1	Cortixin 1	7.485673E-6	-3.510	Unknown	other
Myo1B	Myosin 1B	1.3866271E-4	-3.333	Cytoplasm	other
C15orf23	Chromosome 15 open reading frame 23	4.0513364E-6	-3.049	Unknown	other
Csnk1E	Casein kinase 1, epsilon	1.1423813E-7	-3.006	Cytoplasm	kinase
Tspan6	Tetraspanin 6	3.1708973E-6	-2.729	Plasma Membrane	other
Plod3	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	1.314971E-6	-2.531	Cytoplasm	enzyme

Uchuya et al, Table S4

Table S4. Analysis of differentially expressed genes by RTqPCR.

Differentially expressed genes' validation by RTqPCR				
Wnt				
Gene symbol	Regulation by microarray	Fold change	P-value	Validation by RTqPCR
<i>Acvr1c</i>	UP	5.2838616	0.0000559536	Yes
<i>Acvr2a</i>	UP	2.4383454	0.0029552912	Yes
<i>Dvl3</i>	UP	4.580133	0.0002162574	Yes
<i>Frzb</i>	DOWN	-3.6924949	0.0014074678	Yes
<i>Fzd5</i>	UP	3.4337366	0.0007183289	No
<i>Fzd6</i>	DOWN	-7.5305276	0.0001336503	Yes
<i>Nr5a2</i>	UP	3.385896	0.0000031533	Yes
<i>Mmp7</i>	DOWN	-50.217285	0.0000406142	Yes
<i>Rarb</i>	DOWN	-9.686127	0.0000023553	Yes
<i>Rarg</i>	DOWN	-3.0901685	0.0002838109	Yes
<i>Smo</i>	DOWN	-3.0170665	0.0000010983	Yes
<i>Sox1</i>	UP	3.5006268	0.0000613482	Yes
<i>Sox4</i>	DOWN	-21.243048	0.0000052871	Yes
<i>Sox7</i>	DOWN	-8.95734	0.0022291786	Yes
<i>Sox9</i>	DOWN	-35.4406	0.0000303983	Yes
<i>Sox17</i>	DOWN	-55.627438	0.0001215411	Yes
<i>Sox21</i>	DOWN	-23.753094	0.0000002022	Yes
<i>Src</i>	UP	3.7255604	0.0029647003	Yes
<i>Wif1</i>	DOWN	-1371.4115	0.0000050951	Yes
Notch				
Gene symbol	Regulation by microarray	Fold change	P-value	Validation by RTqPCR
<i>Cntn1</i>	UP	4.9028287	0.0000516206	Yes
<i>Dtx1</i>	UP	22.044329	0.005482353	Yes
<i>Hes5</i>	UP	16.803392	0.0031873303	Yes
<i>Hey1</i>	DOWN	-7.8807583	0.0003987193	No
<i>Jag2</i>	DOWN	-8.332342	0.0000513452	Yes
<i>Notch1</i>	UP	7.1939216	0.0012534232	Yes
<i>Notch4</i>	DOWN	-4.1032467	0.0004885656	Yes
<i>Numb</i>	UP	2.177536	0.0005998851	Yes
Stem cells				
Gene symbol	Regulation by microarray	Fold change	P-value	Validation by RTqPCR
<i>Dtx1</i>	UP	22.044329	0.005482353	Yes
<i>Notch1</i>	UP	7.1939216	0.0012534232	Yes
<i>Acvr1c</i>	UP	5.2838616	0.0000559536	Yes
<i>Sox9</i>	DOWN	-35.4406	0.0000303983	Yes
<i>Fzd6</i>	DOWN	-7.5305276	0.0001336503	Yes
TH/-TR/NHR signaling				
Gene symbol	Regulation by microarray	Fold change	P-value	Validation by RTqPCR
<i>Rarb</i>	DOWN	-9.686127	0.0000023553	Yes
<i>Rarg</i>	DOWN	-3.0901685	0.0002838109	Yes
<i>Nr5a2</i>	UP	3.385896	0.0000031533	Yes
Strongly regulated				
Gene symbol	Regulation by microarray	Fold change	P-value	Validation by RTqPCR
<i>Cxcr5</i>	UP	627.18054	0.009746668	Yes
<i>Aicda</i>	UP	233.39041	0.0038877803	Yes
<i>Expi</i>	DOWN	-1749.5175	0.002538855	Yes
<i>Anxa10</i>	DOWN	-2380.4036	0.0001345142	Yes
<i>Spp1</i>	DOWN	-263.31964	0.0004751938	Yes
<i>Ltf</i>	DOWN	-126.68741	0.0009302593	Yes
<i>Serpina3n</i>	DOWN	-22.09983	0.0003959026	Yes
<i>Tff1</i>	DOWN	-859.4737	0.0036585593	Yes
<i>Trim29</i>	DOWN	-31.6185	0.0003671822	Yes
<i>Wif1</i>	DOWN	-1371.4115	0.0000050951	Yes

Table S5. Analysis of tumors in animals of different age and genotype

AGE: 6-MONTH				
Genotype	Mice N	Incidence N-%	Tumors/animal Mean±SD	Tumor range Absolute n° of tumors
Apc^{1638N/+}	3	3/3 100%	1.33 ± 0.58	1-2
TRa^{0/0}/Apc^{1638N/+}	3	0/3 0%	0*	0

AGE: 8-MONTH				
Genotype	Mice N	Incidence N-%	Tumors/animal Mean±SD	Tumor range Absolute n° of tumors
Apc^{1638N/+}	4	4/4 100%	1.25 ± 0.50	1-2
TRa^{0/0}/Apc^{1638N/+}	5	0/5 0%	0**	0

AGE: 12-15 MONTH				
Genotype	Mice N	Incidence N-%	Tumors/animal Mean±SD	Tumor range Absolute n° of tumors
Apc^{1638N/+}	6	6/6 100%	2.33 ± 0.52	2-3
TRa^{0/0}/Apc^{1638N/+}	9	9/9 100%	1.56 ± 0.53**	1-2

*: P<0.05 and **: P<0.01 compared with Apc mice, by Student T-test.

Article I I

Article de revue :

The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/ β -catenin pathway: An intriguing liaison

Seham Skah^{a,b}, Joel Uchuya-Castillo^a, Maria Sirakov^{a,*}, Michelina Plateroti^{a,*}

a) Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, Département de la recherche, 69000 Lyon, France; b) New adress: Department of Molecular Medicine, Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo, Norway.

*: Corresponding authors

Mailing address: Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), 28 Rue Laennec, 69373 Lyon, France.

Tel: 33 4 69166617

Fax: 33 4 78782720

E-mail: michelina.plateroti@univ-lyon1.fr; mariasirakov@gmail.com

Abstract

The thyroid hormones, T3 and T4, control several developmental and homeostatic processes. From a molecular point of view, most of their actions depend on the activity of the thyroid hormone nuclear receptors (TRs), which are T3-modulated transcription factors. Recent studies have not only highlighted that the physiological response induced by T3 within a cell depends on the expression of specific TRs, but also that the functions of TRs are coordinated by and integrated in other signalling pathways. This is particularly the case for the multilevel interactions between TRs and the Wnt signalling pathway. Interestingly both signals are involved in development and homeostasis, and their alterations are responsible for the development of pathologies, such as cancer. Here, we present findings on the complex crosstalk between TRs and Wnt in several organisms and in different tissue contexts, and speculate on the biological relevance of modulating TR-Wnt functionality in therapeutic approaches aimed to target cancer cells or applications for regenerative medicine.

Keywords: Stem Cells; Thyroid Hormone; Thyroid Hormone Nuclear Receptor; Wnt/ β -catenin



Review article

The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/ β -catenin pathway: An intriguing liaison



Seham Skah¹, Joel Uchuya-Castillo, Maria Sirakov*, Michelina Plateroti*

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre Léon Bérard, Département de la recherche, 69373 Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Stem cells
Thyroid hormone
Thyroid hormone nuclear receptor
Wnt/ β -catenin

ABSTRACT

The thyroid hormones, T3 and T4, control several developmental and homeostatic processes. From a molecular point of view, most of their actions depend on the activity of the thyroid hormone nuclear receptors (TRs), which are T3-modulated transcription factors. Recent studies have not only highlighted that the physiological response induced by T3 within a cell depends on the expression of specific TRs, but also that the functions of TRs are coordinated by and integrated in other signalling pathways. This is particularly the case for the multilevel interactions between TRs and the Wnt signalling pathway. Interestingly both signals are involved in development and homeostasis, and their alterations are responsible for the development of pathologies, such as cancer. Here, we present findings on the complex crosstalk between TRs and Wnt in several organisms and in different tissue contexts, and speculate on the biological relevance of modulating TR-Wnt functionality in therapeutic approaches aimed to target cancer cells or applications for regenerative medicine.

1. The thyroid hormones and the nuclear receptors TRs

The thyroid hormones (THs) and their nuclear receptors (TRs) play various roles in developmental, homeostatic and metabolic processes (rev. in [Tata, 2006](#); [Sinha et al., 2014](#)). These include the activity of TH-TR alone or in combination with other pathways. In this review we will focus on their multilevel interaction with the canonical Wnt/ β -catenin pathway and the effects of this complex crosstalk on development, homeostasis and cancer.

1.1. TH synthesis, transport and metabolism

1.1.1. TH synthesis

The THs are synthesized by the thyroid gland and this process is tightly controlled by the hypothalamus-pituitary-thyroid axis ([Fig. 1](#)) (rev. in [Wondisford, 2004](#)). The thyrotropin-releasing hormone (TRH) is produced within the hypothalamus and subsequently secreted and transported *via* the axons to the pituitary gland. There it binds to TRH receptors, which induce the production of the thyroid-stimulating hormone (TSH) in the anterior pituitary cells. The binding of TSH to its receptor, located in the thyroid follicular cells, leads to the synthesis of L-thyroxine (T4, the pro-hormone) and 3,5,3'-L-triiodothyronine (T3, considered the active hormone) with a 40-fold higher production

of T4 than T3. The TSH is not only the main regulator of the production of THs, but also plays a key role in thyroid development and growth ([Wondisford, 2004](#)). As mentioned above, all of the processes involved in the production of THs are strictly controlled, both by positive and negative feedback regulation steps, given that THs negatively regulate TSH and TRH production. In addition to this systemic regulation of TH levels, the local availability and signalling in individual tissues and/or cell types is also tightly controlled. Indeed, intracellular concentrations of THs depend on the presence of plasma membrane transporters and on the presence and activity of multiple TH-metabolizing enzymes ([Fig. 2](#)) (rev. in [Bianco and Kim, 2006](#); [Kinne et al., 2011](#)).

1.1.2. Cellular TH transporters

Several studies have described highly specific TH transporters for T3 and T4 (rev. in [Visser et al., 2010](#); [Visser et al., 2011](#)) ([Fig. 2A](#)), among which the monocarboxylate 8 (MCT8) is one of the most extensively characterized ([Kinne et al., 2011](#)). Its inactivating mutations in patients cause the Allan-Herndon-Dudley syndrome characterized by normal TSH, elevated T3, and decreased T4 serum levels ([Friesema et al., 2004](#); [Wirth et al., 2009](#)). However, mouse models for MCT8-deficiency (MCT8-KO mice) only partially reproduce the syndrome, since the animals display a 50% reduction in T4 and T3 transport ([Dumitrescu et al., 2006](#); [Trajkovic et al., 2007](#); [Wirth et al.,](#)

* Corresponding authors.

E-mail addresses: sirakovmaria@gmail.com (M. Sirakov), michelina.plateroti@univ-lyon1.fr (M. Plateroti).

¹ New address: Department of Molecular Medicine, Institute of Basic Medical Sciences, University of Oslo, Norway.

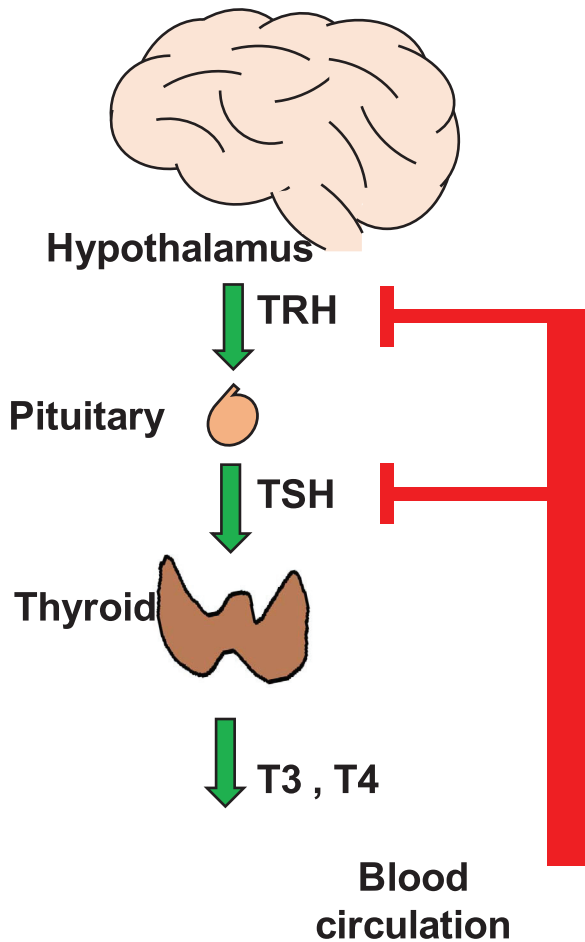


Fig. 1. Regulation of the synthesis of thyroid hormones. The schematic diagram represents the complex hypothalamus-pituitary-thyroid regulatory loop. The thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulates the synthesis of the thyroid-stimulating hormone (TSH) in the anterior pituitary cells, which in turn stimulates the synthesis in the thyroid of the thyroid hormones (TH), T3 and T4, subsequently secreted into the bloodstream. Increased levels of circulating THs repress the expression of TRH and TSH, thus maintaining constant levels of circulating hormones.

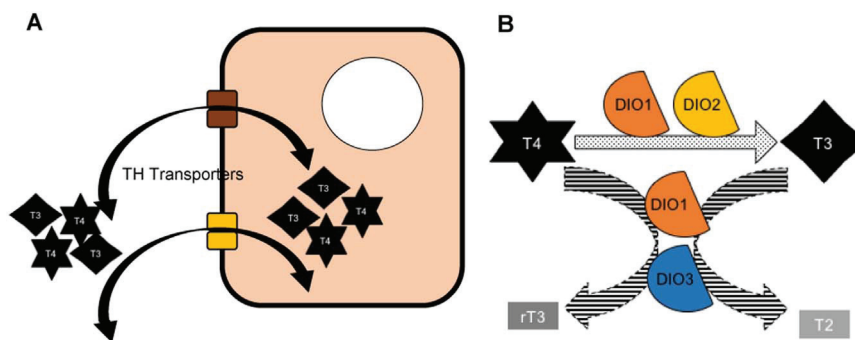


Fig. 2. The transport and metabolism of thyroid hormones. A) The thyroid hormones (THs), T3 and T4, enter the cells via specific transporters, belonging to the monocarboxylate transporter (MCT) and organic anion-transporting polypeptide (OATP) protein families. These same transporters are also responsible for the efflux of the THs from the cells. B) Both T3 and T4 can be metabolized by the deiodinases. DIO1 and DIO2 catalyse the synthesis of T3, while DIO1 and DIO3 degrade both T4 and T3 into the inactive rT3 and T2 forms.

2009). This result suggests that other transporters could also be present and compensate for the loss of MCT8 expression. Indeed, secondary TH transporters have also been described and it was demonstrated that THs are ligands for several types of transporters (rev. in Visser et al., 2010; Visser et al., 2011), including the Na/taurocholate co-transporting polypeptide SLC10A1, belonging to the solute carrier family of proteins (Friesema et al., 1999), multidrug resistance-associated proteins (Mitchell et al., 2005), the heterodimeric

L-type amino acid transporters (LATs), LAT1 and LAT2 (rev. in Jansen et al., 2005), and various members of the organic anion-transporting polypeptide (OATP) family (rev. in Hagenbuch, 2007; van der Deure et al., 2010). Most of these transporters accept a variety of ligands, with the notable exception of MCT8 (SLC16A2), and to a lesser extent MCT10 (SLC16A10) and OATP1C1 (SLCO1C1). Despite the extensive characterization of these different THs-transport proteins, the specific mechanisms underlying their role in the regulation of the uptake or efflux of THs remain unknown. Moreover, regarding MCT10 there are currently no reports describing mutations of this gene in patients, and its implication in the transport of THs is limited to findings on MCT10-KO animals (Abe et al., 2012; Muller et al., 2014).

1.1.3. Intracellular metabolism of THs

The intracellular metabolism of T3 and T4 represents another level of local regulation of the availability of THs. This process is controlled and regulated by the iodothyronine deiodinase selenoenzymes (DIOs) (rev. in Bianco and Kim, 2006) (Fig. 2B), which convey different functions. DIO2 converts the pro-hormone T4 to the active T3 form, while DIO3 transforms both T3 and T4 into the inactive T2 and rT3 forms, respectively. Finally, DIO1 was shown to have both activating and inactivating activities (Bianco and Kim, 2006). It was reported that in physiological conditions, this regulation accounts for the 80% of circulating T3 levels. Interestingly, in parallel to the control exerted by circulating TH levels on the central hypothalamus-pituitary-thyroid axis, responsible for TH synthesis, a similar finely tuned regulation, involving both positive and negative feedback mechanisms, has been described in peripheral organs to modulate the expression of *DIO* genes (Bianco and Kim, 2006). For instance, the expression of *DIO1* is positively regulated by T3 (Zavacki et al., 2005), which may account for the increase in DIO1 activity observed in hyperthyroid patients (Abuid and Larsen, 1974; Laurberg et al., 2007; Ito et al., 2011). Moreover, *DIO2* and *DIO3* genes can also be regulated by hypo- and hyperthyroidism, respectively, which is in the case of *DIO3* dependent on the TR α 1 receptor (Tu et al., 1999; Wagner et al., 2007). Despite the large amount of data on the modulation of the expression of *DIO* genes by THs, the molecular mechanisms underlying such regulation remain to be clarified. Indeed, the only detailed descriptions available present the direct transcriptional regulation of *DIO1* by TRs through specific DNA

binding on the promoter (Jakobs et al., 1997; Toyoda et al., 1995).

1.2. Structure of the TRs

The TRs were first cloned in 1986 (Sap et al., 1986; Weinberger et al., 1986) and were described as T3-dependent members of the nuclear hormone receptor (NHR) superfamily of transcription factors (Laudet, 1997). Indeed, T3 is the natural ligand of TRs, with a 10/15-

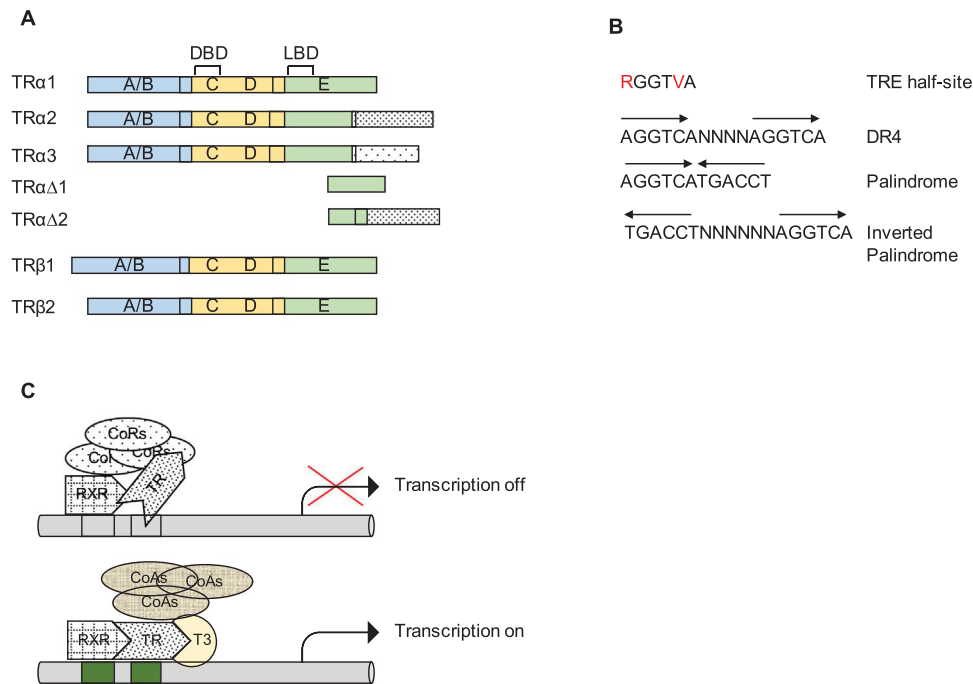


Fig. 3. The TRs and their molecular mechanisms of action on target genes. A) Representation of the isoforms encoded by TR α or TR β genes and of their modular structure. The diagram presents the different domains involved in the functions of TRs. These include the DNA binding domain (DBD) and ligand binding domain (LBD) that are specifically present in the TR α 1, TR β 1 and TR β 2 proteins, *bona fide* T3 nuclear receptors. TR α 2, TR α 3 and the truncated TR Δ isoforms lack either one or both domains. Other functional regions of the TRs include cofactor-binding domains (located in A/B, D and E) and dimerization domains (located in C and E). N-terminal and C-terminal domains are important for transcriptional activation. B) Different arrangements of the Thyroid Hormone Responsive Elements (TRE). The TREs are constituted by the repetition of two half-sites (upper panel) in different arrangements as indicated. C) Molecular mechanisms underlying the modulation of gene transcription by TRs. In the absence of T3, TR interacts with the TREs present on target genes and forms a heterodimer with Retinoid X Receptors (RXRs). The complex recruits co-repressor (CoRs) proteins that block transcription initiation. In the presence of T3 the CoRs are released and co-activators (CoAs) are recruited, enabling gene transcription.

fold higher binding affinity than T4, and represents the most abundant hormone bound to the receptors. The TRs share a similar domain organization with other NHRs, and present a DNA-binding domain (DBD) and a ligand-binding domain (LBD) responsible for DNA binding on specific sequences and for T3 binding, respectively (Fig. 3A). Two genes in humans, namely *THRA* (chromosome 17) and *THRB* (chromosome 3), encode TRs. Alternative splicing mechanisms and/or occurrence of different promoters in both genes are responsible for the generation of several protein isoforms, with TR α 1 and TR β 1 being considered as the main isoforms (Cheng, 2000) (Fig. 3A). Two TR β isoforms (TR β 1 and TR β 2) are produced in humans and mice (rev. in Flamant and Samarut, 2003), with highly homologous DBD and LBD sequences, but which display different lengths and amino acid sequences in their amino-terminal A/B domain. For instance, transcriptional events mediated by tissue-specific promoters lead to the presence of distinct amino-terminal regions in TR β 2 (Oberste-Berghaus et al., 2000). TR β 1 and TR β 2 endogenously display a functional specificity for target genes, despite the fact that they exhibit a similar activity in *in vitro* transient gene expression assays (Oberste-Berghaus et al., 2000). A tissue-specific and/or nuclear-specific environment may account for the differences observed endogenously compared to experimentally altered settings.

The *THRA* locus in mouse and human genomes encodes five TR α isoforms. The transcription of TR α 1, TR α 2 and TR α 3 is under the control of a promoter located upstream of the transcriptional start site (rev. in Bassett et al., 2003), while that of TR Δ 1 and TR Δ 2 depends on an internal intronic promoter (Chassande et al., 1997). Among the different TR α isoforms, TR α 1 alone possesses a complete and functional DBD and LBD, thus representing the only *bona fide* NHR (Bassett et al., 2003). TR α 2 shares 100% homology with the first 370 amino acids of TR α 1, but an alternative-splicing event leads to an inactive LBD, resulting in its inability to bind T3 (Mitsuhashi et al., 1988). Although highly similar to TR α 2, TR α 3 differs slightly since it

lacks the first 39 amino acids (Mitsuhashi et al., 1988). TR Δ 1 and TR Δ 2 are truncated TR isoforms transcribed from a promoter located in intron 7 and, by consequence, they lack both the DBD and LBD (Chassande et al., 1997). These four isoforms may behave as antagonists of TR α 1 or TR β receptors, owing to their complete lack or to the loss of function of DBD/LBD (Chassande et al., 1997; Koenig et al., 1989).

1.3. Molecular mechanism of TR action

An increasing amount of data underline the importance of the non-genomic functions of THs (rev. in Cheng et al., 2010; Davis et al., 2011; Davis et al., 2008). For the specific aims of this review we will, however, focus on the genomic actions of TRs.

TRs modulate the transcription of target genes by binding to specific DNA sequences called thyroid hormone response elements (TREs) (Fig. 3B). The TREs were identified as a consensus half-site sequence [(A/G)GGT(C/G/A)A] separated by four base pairs, also known as direct repeat 4 (DR4) (Yen, 2001). The arrangement of the half-sites, however, can differ from the canonical DR4 and they can be organized as palindromes or inverted palindromes (Fig. 3B). In addition, the number of nucleotides separating the half-sites can vary depending on their orientation (Yen, 2001). TREs organized as DR4 are more common than the inverted repeats (Chatonnet et al., 2013), and various types of TREs were shown to be present on target genes, possibly to optimize the interaction between DNA and TRs (Williams et al., 1991). On DNA TRs form heterodimers with the Retinoid X Receptors (RXRs) (Fig. 3C), which are also part of the NHR superfamily (Laudet, 1997). The LBD in addition to its role in the binding of T3, is also involved in the dimerization of TRs, by increasing the binding of TRs to TREs and thus the efficiency of the transcriptional activity (Lonard and O'Malley, 2007; Zhang and Kahl, 1993). The LBD also ensures the transactivation and basal repression of unliganded

TRs, through its interaction with corepressors (CoRs) and coactivators (CoAs) (Lonard and O'Malley, 2007). Additionally, the amino-terminal A/B domain, the structure of which varies among TR isoforms, is also important for transcriptional activations and interactions with co-factors or other transcription factors (Banahmad et al., 1993; Hadzic et al., 1995; Oberste-Berghaus et al., 2000). Indeed, it may influence the conformation of the DBD and the repertoire of TREs to which it can bind (Judelson and Privalsky, 1996). The binding of T3 to TRs, in the case of positively regulated genes, induces structural changes causing the dissociation of CoRs and the recruitment of CoAs, which finally stimulates transcription (Fig. 3C) (Wagner et al., 1995). However, some genes are negatively regulated by T3, such as *TRH* and *TSH*, underlining yet again the importance of negative feedback controls on the production of THs. In both cases the presence of TREs has been reported in the promoter of these genes (Bodenner et al., 1991; Chatterjee et al., 1989; Hollenberg et al., 1995), though the binding of TR to DNA appears to be weaker than in the T3-positively regulated genes. So far, the detailed mechanisms underlying the active repression by liganded TRs have been poorly defined, although CoRs and CoAs may also be involved in the control of negatively-regulated genes. Indeed, while CoRs behave as activators, CoAs were shown to induce the repression of *TSH* and *TRH* upon T3 binding to TR β (Hollenberg et al., 1995; Tagami et al., 1997).

2. The Wnt signalling pathway

The Wnt signalling pathway, named after the *Drosophila* ligand wingless (Wg) and its mouse homolog Int-1 (Wnt-1) (Baker, 1988), is one of the most important signalling pathways that plays an essential role in embryonic development and tissue homeostasis in adult organisms (rev. in Croce and McClay, 2008). The complexity of Wnt signalling is due to the implication of several proteins (secreted, membrane-bound, intracellular or nuclear), which modulate its activity. So far, 19 Wnt ligands and 10 transmembrane frizzled (Fzd) receptors have been identified in mammals, which can generate, in theory, 190 potential Wnt-Fzd combinations (Dijksterhuis et al., 2014; Willert and Nusse, 2012). Moreover, the expression of these proteins is regulated in a spatio-temporal manner and the ligand-receptor interaction forms a specific complex able to initiate an optimal activation of Wnt signalling (van Amerongen et al., 2008).

The Wnt pathway includes three different signalling pathways, all of which depend on the binding of Wnt ligands to Fzd receptors (rev. in Montcouquiol et al., 2006): i) the canonical Wnt/ β -catenin involves the stabilization of β -catenin and regulates embryonic morphogenesis, development and homeostasis, as well as stem cell biology (MacDonald et al., 2009), ii) the non-canonical Wnt/ Ca^{++} pathway, and iii) the dishevelled (Dvl)-C-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway also termed "planar cell polarity". The non-canonical Wnt pathways are involved in cell polarity and cytoskeletal (re)modelling, as well as in cell migration and differentiation (Semenov et al., 2007). Wnt ligands elicit a canonical or non-canonical response depending on cell type, environment and receptor milieu. For the aim of this review, we will focus on the canonical Wnt/ β -catenin pathway (Fig. 4).

2.1. The Wnt/ β -catenin pathway

β -catenin is a multifunctional protein that was originally described as an E-cadherin-binding protein implicated in the regulation of cell-cell adhesion (Nagafuchi and Takeichi, 1989; Ozawa et al., 1989), and subsequently as a transcriptional regulator of the canonical Wnt signalling pathway (Kikuchi et al., 2011). In the absence of Wnt ligands (off-state) (Hurlstone and Clevers, 2002), β -catenin is present in low intracellular levels, due to its sequestration within a multicomponent destruction complex. This latter is composed of the scaffolding proteins, including axin, adenomatous polyposis coli (APC), casein kinase 1 α (CK1 α), and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). Upon

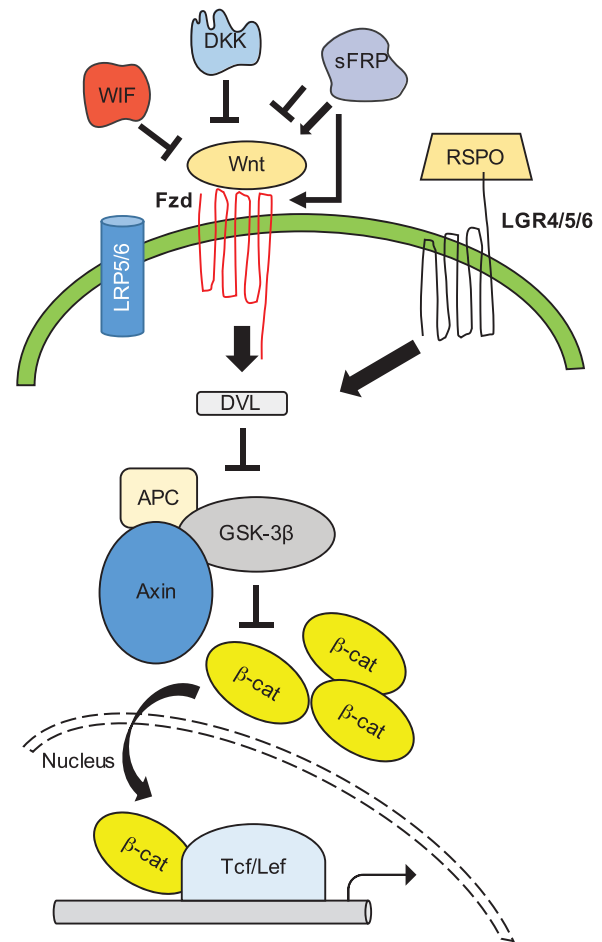


Fig. 4. The canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway. In the canonical pathway, binding of Wnt to a frizzled (Fzd) receptor in association with a co-receptor, namely LRP5 or LRP6, leads to the activation of Dishevelled (DVL). DVL inhibits the ability of GSK3 β to target β -catenin (β -cat) for degradation, leading to an increase in cytoplasmic β -catenin. Cytoplasmic β -catenin, in turn, is translocated to the nucleus, where it forms complexes with members of the Tcf/Lef family, leading to changes in transcription. Several additional proteins also modulate the Wnt pathway. Indeed, R-spondin (RSPO) proteins interact on the cell surface with members of the LGR4/5/6 family, to enhance Wnt signalling. Secreted inhibitors of Wnt activity include the DKK and WIF proteins, while members of the sFRPs are considered to be modulators, as they can both activate or inhibit the canonical Wnt pathway through an action on Wnt ligands or on Fzd receptors.

phosphorylation, β -catenin is targeted for proteasomal degradation by the E3 ubiquitin ligase, β -transducin repeat-containing protein (β -TrCP) (Aberle et al., 1997; Liu et al., 2002). When the secreted Wnt ligands bind to the seven transmembrane Fzd receptors and low density lipoprotein receptor-related protein co-receptor 5/6 (LRP5/6) on the cell surface (on-state) (Fig. 4), the destruction complex is inactivated and the protein dishevelled (DVL) is recruited to the cytoplasmic domain of Fzds. This association leads to the stabilization of β -catenin and to its migration to the nucleus, where it acts as a transcriptional co-activator by associating with the T-cell factor (Tcf)/lymphoid enhancer-binding factor (Lef) transcription factors. Finally, the binding of β -catenin to Tcf/Lef activates Wnt target genes, such as *CCND1* and *c-MYC* (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999). It is worth noting that in the Wnt-off state the transcription factors Tcf/Lef bind to transcriptional inhibitors of the Groucho family and recruit histone deacetylase enzymes to mediate transcriptional repression (Cavallo et al., 1998; Hurlstone and Clevers, 2002).

2.2. Wnt ligands and receptors

All of the 19 Wnt ligands are secreted glycoproteins (Smolich et al., 1993; Tanaka et al., 2002), which also carry a lipid modification in the form of a palmitate group, necessary for Wnt signalling (Willert et al., 2003). As mentioned above, Wnt ligands can signal either through canonical or non-canonical Wnt signalling pathways. For example, Wnt1, Wnt3a and Wnt10b are considered to be “canonical Wnts”, whereas Wnt4, Wnt5a, Wnt5b and Wnt11 are known as “non-canonical Wnts”, while several Wnts have been shown to activate both canonical and non-canonical pathways, depending on specific Fzd receptors and LRP co-receptors (Miller, 2002).

Wnt ligands signal by binding to the Fzd receptors, characterized by a large extracellular structure with a conserved cysteine rich domain (CRD), which is essential for the interaction with the Wnts (Bhanot et al., 1996). The cytoplasmic part of Fzds interacts directly with the PDZ (PSD-95/dies large/ZO-1 homologous) domain of DVL (Chen et al., 2003), initiating the intracellular cascade of Wnt signalling. Moreover, Fzd receptors can form complexes with other proteins, such as R-spondins (RSPO) (Nam et al., 2006), Norrins (Xu et al., 2004) and secreted frizzled-related proteins (sFRP) (Bafico et al., 1999; Rodriguez et al., 2005), that can both stabilize or inhibit Wnt signalling. Finally, RSPO also interacts on the cell surface with members of the LGR protein family (LGR4/5/6) resulting in enhanced Wnt signalling (rev. in de Lau et al., 2012) (Fig. 4).

As already mentioned, the transduction of the canonical Wnt signal also requires the presence of the LRP5/6 co-receptors, which together form a ternary complex Wnt-Fzd-LRP (Tamai et al., 2000). LRP5 and LRP6 are single-pass transmembrane proteins with a large extracellular domain containing several potential regions for protein-protein interactions. In the cytoplasm, LRP5/6 is phosphorylated by the GSK3 β and CK1, leading to the release of axin from the destruction complex and its recruitment to the membrane (Herz et al., 2009; Zeng et al., 2005).

2.3. Wnt modulators

Several secreted proteins can also regulate Wnt signalling by binding either to Wnt ligands or to Fzd/LRP receptors. These secreted regulatory proteins may act as antagonists (Wnt inhibitory factor, Dkkopf), agonists (Norrin, R-spondin) or as negative and positive modulators (secreted frizzled-related proteins) of the Wnt signalling pathway in a tissue-dependent manner (rev. in MacDonald et al., 2009).

Focusing specifically on the secreted frizzled-related proteins (sFRPs), they were initially and independently identified as secreted glycoproteins (Leysn et al., 1997; Wang et al., 1997; rev. in Cruciat and Niehrs, 2013). sFRPs were named as such, since their N-terminal region includes a CRD region highly homologous to that of the Fzd receptors (Cruciat and Niehrs, 2013). Five mammalian sFRPs (1–5) have been identified to date, while additional family members (Crescent, Sizzled, Sizzled-2n and Frzb-2) have been characterized in *Xenopus* and chick models (Finch et al., 1997; Salic et al., 1997). Several studies have shown their involvement in early embryonic development (Leysn et al., 1997; Wang et al., 1997) and as modulators of apoptotic events (Melkonyan et al., 1997). For instance, while sFRP2 has an anti-apoptotic function, sFRP1 confers sensitivity to apoptotic stimuli (Ko et al., 2002; Lee et al., 2004). In addition, sFRP2 has also been implicated in embryogenesis (Satoh et al., 2006), cell differentiation (Deb et al., 2008; Descamps et al., 2008) and bone development (Morello et al., 2008).

The first isolated member of the family, sFRP3, was shown to bind to Wnt ligands and prevents the activation of the canonical Wnt signalling pathway, suggesting a Wnt antagonist function through ligand sequestration (Kawano and Kypta, 2003). Additional studies have, however, complicated this simple scenario (rev. in Bovolenta

et al., 2008) and demonstrated that sFRPs can enhance Wnt diffusion and positively modulate Wnt signalling (Mii and Taira, 2009). Finally, different studies have also reported a down-regulation of sFRPs in various cancers (Suzuki et al., 2004; Zhou et al., 1998), suggesting potential tumour-suppressor roles. Concerning sFRP2, its effect on the canonical Wnt pathway is still puzzling. In fact, sFRP2 has been shown to be both an activator (von Marschall and Fisher, 2010; Yamamura et al., 2010) and an inhibitor (Alfaro et al., 2010; Suzuki et al., 2004) of Wnt activity in different cellular contexts. As for other sFRPs, the sFRP2 gene has been reported to be hypermethylated and, by consequence, the expression of sFRP2 strongly repressed in several cancers, including colorectal cancer (Cheng et al., 2007; Huang et al., 2007). Owing to its hypermethylation and decreased expression in cancers characterized by an activated Wnt signalling pathway, sFRP2 is considered to be a tumour-suppressor gene with an inhibitory action on Wnt activity. Consistently, it was shown to inhibit the Wnt pathway and maintain the quiescence of hematopoietic stem cells in mice (Cain et al., 2013). In our group we obtained opposite results and demonstrated *in vitro* that in the intestinal epithelium progenitors, sFRP2 behaves as a positive regulator of the canonical Wnt pathway by stabilizing β -catenin, through the Fzd receptors (Kress et al., 2009a). More recently, we showed that sFRP2 contributes to the physiology of precursor cells of the intestinal epithelium by controlling apoptosis and cell fate decisions (Skah et al., 2015). Moreover, by crossing *Sfrp2*^{-/-} mice with the Wnt-reporter mouse model TopGal (DasGupta and Fuchs, 1999) we observed that the lack of sFRP2 expression reduced the intestinal Wnt activity *in vivo*. We also used an *in vitro* approach on cell lines and showed that sFRP2 has a positive effect on the Wnt-reporter TopFlash. Altogether, our studies demonstrated that sFRP2 activates the canonical Wnt pathway both in *in vivo* and *in vitro* models (Skah et al., 2015).

3. Crosstalk between TH-TR and the Wnt pathway

As highlighted in the previous sections, Wnt and TH/TR-dependent pathways are important modulators of developmental and homeostatic processes in several tissues and organs (rev. in Clevers, 2006; Tata, 2006). Moreover, emerging data have also underlined the importance of those signals on adult stem cell physiology (Ishizuya-Oka et al., 2009; Kress et al., 2008; Lopez-Juarez et al., 2012; Milanese et al., 2016; Sirakov et al., 2012; rev. in Clevers et al., 2014). Interestingly, some members of the NHR superfamily display several levels of functional and physical interactions with the Wnt pathway (rev. in Beildeck et al., 2010; Mulholland et al., 2005). For instance the vitamin D receptor (VDR), the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and the androgen receptor (AR), are found in a complex with both β -catenin and Tcf/Lef, while others, such as the oestrogen receptor (ER) and AR can be found in a complex with Tcf/Lef in the absence of β -catenin (Amir et al., 2003; Cianferotti et al., 2007; El-Tanani et al., 2001; Jansson et al., 2005; Song et al., 2003). The functional outcomes of these protein-protein interactions can also differ depending on the NHR. It is generally assumed that β -catenin synergistically activates NHR activity, and NHR reciprocally deactivates or even represses the activity of β -catenin (Beildeck et al., 2010; Mulholland et al., 2005). This effect can be attributed to a large number of mechanisms, including E-cadherin expression, the competition between Tcf/Lef and NHRs for binding to β -catenin and/or p300, or the recruitment of co-repressors, such as TLE, NCoR, and SMRT (Beildeck et al., 2010; Mulholland et al., 2005). However, these interactions are highly dependent on the cellular context, which can create divergent effects. For example, VDR super-activates β -catenin in keratinocytes (Cianferotti et al., 2007), but attenuates its activity in colorectal cancer (Easwaran et al., 1999; Palmer et al., 2001; Shah et al., 2006).

Focusing more specifically on TRs, there are different levels of crosstalk with the canonical Wnt pathway, including the regulation of

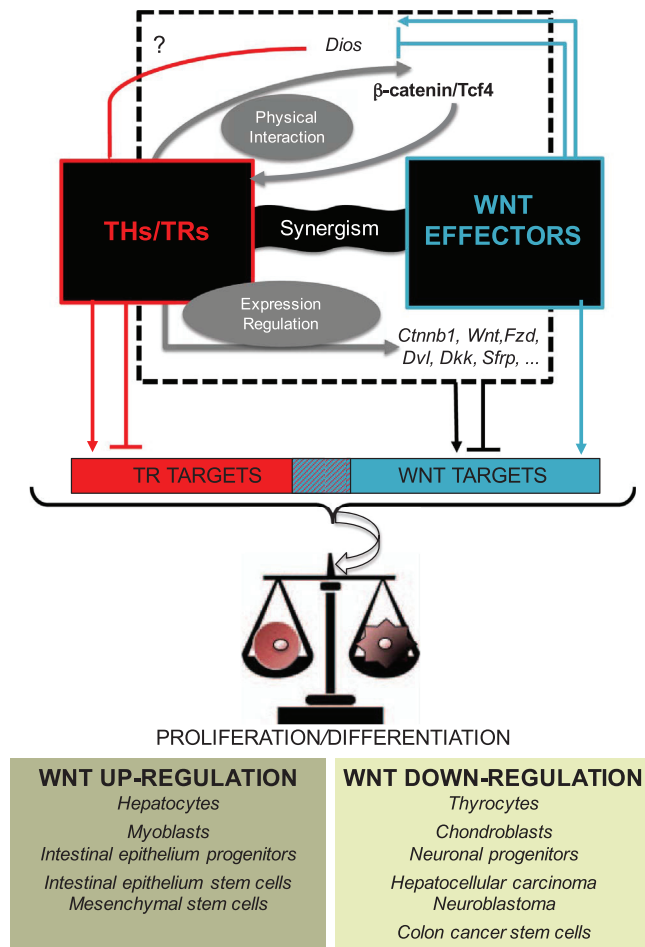


Fig. 5. Current view on the crosstalk between TH-TRs and the canonical Wnt pathway. The diagram depicts the different levels of TR-Wnt crosstalk and shows how these complex interactions are responsible for cell-specific control of the balance between cell proliferation and cell differentiation. Firstly, THs/TRs can modulate the expression of Wnt target genes by controlling the expression of several effectors of the Wnt pathway or by having an effect on target genes common to both pathways (striped box). Secondly, the physical interaction between TRs and β -catenin/Tcf4 proteins can induce the modulation of Wnt targets, and thus Wnt response depending or not on TH levels. Intriguingly, the physical interaction can also diminish TR availability for its target genes, altering their expression levels. Thirdly, a synergistic effect is also possible resulting in an increased response to both signals. Interestingly, the *Dio* genes, encoding TH-activating and inactivating enzymes, are controlled by the Wnt pathway, finally controlling TR functionality. Importantly, all of these interactions can result in Wnt activation or inhibition depending on the cellular context.

gene expression, physical interaction and functional synergism in both physiological and pathological conditions. These functional interactions occur in different tissues and can involve either TR α or TR β receptors, the final outcome of the crosstalk depending on the cellular context, where T3 can either induce proliferation or differentiation (rev. in Kress et al., 2009b). As a consequence, the interaction can result in a tissue-specific Wnt activation or repression, which can even differ in the same cellular context depending on the physiological or pathological state (summarized in Fig. 5).

3.1. Regulation of the expression of Wnt components

Several *in vivo* and *in vitro* studies have described the effects of THs and/or TRs on the expression of genes belonging to the Wnt pathway (Table 1). However, this regulation has only been ascribed to a direct transcriptional control by the TRs on TREs in a limited number of genes.

In the case of the *Ctnnb1* and *CTNNB1* genes, encoding the mouse

and human β -catenin, respectively, different transcriptional regulations by THs have been described. Indeed, TR α for example stimulates the transcription of the *Ctnnb1* gene in precursor cells of the mouse intestinal epithelium, through its binding to an intronic TRE element (Plateroti et al., 2006). However, this element has not been found within the homologous intronic region of the human *CTNNB1* gene (personal unpublished observation). In thyrocytes, TR β 1 can bind to a TRE present within the promoters of *Ctnnb1/CTNNB1* and this binding has a repressive action on transcription (Guigon et al., 2010). Regarding the gene encoding β -catenin, multiple regulatory elements exist responsible for the differential regulation by T3 in a TR isoform-, tissue-, and specie-specific manner. Another directly regulated TR α 1 target gene is *Sfrp2* (Kress et al., 2009a), encoding a secreted protein, which as mentioned above, is highly homologous to the CRD domain of the Wnt receptors Fzd (Cruciat and Niehrs, 2013). The positive regulation of *Sfrp2* gene by TH-TR has been described in both mouse and tadpole intestine, during postnatal maturation steps (Buchholz et al., 2007; Kress et al., 2009a), and both in mouse and xenopus a TRE has been reported in gene promoters (Kress et al., 2009a; Hasebe et al., 2016).

Recently, a pivotal role for TR α 1 was unveiled in the control of proliferation and differentiation of skeletal muscle myoblasts, as well as in *in vivo* skeletal muscle regeneration after injury, which relies on Wnt signalling (Milanesi et al., 2016). For instance, the role of TR-THs in prenatal muscle development and/or postnatal muscle growth was already clear since TR-null mice show smaller muscle fibre size and less type 2 fast fibre compared with WT, and in the TR α -null mouse this phenotype is more pronounced than in TR β -null mice (Yu et al., 2000), indicating a prominent role for TR α over TR β in this context. In accordance with these findings, knockdown of TR α in the murine skeletal muscle myoblastic cell line C2C12 and in primary skeletal muscle myoblasts, dramatically reduces the expression of *Ctnnb1* and *Wnt10b*, as well as the Wnt target, *Ccnd1* (Milanesi et al., 2016). In addition, the concomitant reduction in the level of the β -catenin protein and of its nuclear localization was reported (Milanesi et al., 2016), similarly to findings described in precursor cells of the intestinal epithelium of mice or tadpoles (Plateroti et al., 2006; Hasebe et al., 2016).

Circulating TH levels can also affect bone mass and bone turnover, due to the regulation of the Wnt inhibitors Dkk1 and sclerostin (Tsourdi et al., 2015). This effect is dependent on the TR β receptor, given that a mutation in TR β 1 induces advanced bone formation in mice through the activation of the canonical Wnt signalling (O'Shea et al., 2012). Another cell type-specific action of THs is on growth plate chondrocytes, in which the hormones stimulate both growth and differentiation through the induction of IGF-1 (Wang et al., 2010) or Carboxypeptidase Z-dependent Wnt stimulation (Wang et al., 2009, 2010). Finally, T3 promotes the *in vitro* differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) towards chondrocyte-like cells by activating Wnt. Indeed, MSCs cultured as spheroids and treated with chondrogenic medium containing T3, displayed increased levels of β -catenin, Fzd7 and GSK-3 β (Fernandez-Pernas et al., 2016).

Another example of gene expression modulation by THs includes the control of Dkk4 expression by T3 in hepatoma cells, responsible for inhibiting cell migration (Chi et al., 2013; Liao et al., 2012). The liver is a well-known TH-TR organ target (rev. in Brown et al., 2013; Perra et al., 2016), but the broad spectrum of activities conveyed by THs and their eventual control of the Wnt pathway in this organ remain puzzling. In fact, T3 acts as a hepatic mitogen on normal mouse and rat liver cells *via* the TR β receptor (Kowalik et al., 2010) and promotes Wnt signalling through β -catenin activation by the protein kinase A (Fanti et al., 2014). Despite this pro-mitogenic action on normal liver, local hypothyroidism favours the progression of pre-neoplastic lesions into hepatocellular carcinoma in rats (Frau et al., 2015). However, it is not clear whether this latter process involves or not an effect on Wnt signalling.

Table 1
Action of the TRs on the Wnt pathway in different cell types.

Cell Type	TR(s)	Regulation of Wnt	Target Genes	References
Hepatocytes	TR β	Up	Cyclin D1 ^a	Kowalik et al., 2010; Pibiri et al., 2001
Hepatocarcinoma cells	TR α , TR β	Down	Dkk4 ^a	Chi et al., 2013; Liao et al., 2012
Pancreatic β -cells	TR α , TR β	ND	Cyclin D1 ^a	Furuya et al., 2010
Intestinal epithelium progenitors	TR α	Up	β -catenin ^a , sFRP2 ^a	Plateroti et al., 2006; Kress et al., 2009a
Colon cancer cells/stem cells	TR α	Down	Various ^{a,b}	Dentice et al., 2012 Catalano et al., 2016
Skeletal muscle myoblasts	TR α	Up	β -catenin ^a , Wnt10b ^a , Cyclin D1 ^a	Milanesi et al., 2016
Keratinocytes and Keratinocyte progenitors	TR α , TR β	ND	Cyclin D1 ^b	Contreras-Jurado et al., 2011
Oligodendrocyte precursors	ND	Down	Cyclin D1 ^b , c-Myc ^b	Tokumoto et al., 2001
Neuroblastoma cells	TR β	Down	Cyclin D1 ^b , c-Myc ^b	Lebel et al., 1994; Perez-Juste et al., 2000
Subventricular zone progenitors	TR α	ND	Cyclin D1 ^b , c-Myc ^b	Lemkine et al., 2005; Hassani et al., 2007 Lopez-Juarez et al., 2012
Tyocytes	TR β	Down	β -catenin ^b	Guigon et al., 2010
Mesenchymal stem cells	ND	Up	β -catenin ^a , Frizzled7 ^a , GSK-3 β ^a	Fernandez-Pernas et al., 2016
Chondrocytes and bone-forming osteoblasts	TR β	Down	Dkk1 ^a , Sclerostin ^a	O'Shea et al., 2012; Tsourdi et al., 2015

ND: Not Determined

^a Up-regulated

^b Down-regulated

3.2. Physical interactions

As already mentioned, several NHRs can physically interact with β -catenin and/or Tcf/Lef in a specific manner (Beildeck et al., 2010; Mulholland et al., 2005). Following this discovery, these interactions soon became an attractive field of investigation, particularly in the context of TRs. TR β 1 and β -catenin were for instance shown to interact directly and to form a complex in thyrocytes (Guigon et al., 2008). This study, however, did not define the involvement of Tcf/Lef nor the effect on the activity of TR β 1. Our studies on intestinal epithelial cells revealed that TR α 1 interacts with β -catenin and that this interaction also involves Tcf4 (Sirakov et al., 2012). There are two major differences between the interaction of TR α 1/ β -catenin/Tcf4 in the intestinal epithelium and that of TR β 1/ β -catenin in thyrocytes. The first is the destabilization of the TR β 1/ β -catenin complex by the hormone T3 (Guigon et al., 2008), while we found no evidence of any T3-mediated effect on the TR α 1/ β -catenin/Tcf4 complex (Sirakov et al., 2012). The second is the action of the complex on the Wnt pathway. Indeed, TR β 1 induces the degradation of β -catenin (Guigon et al., 2008), whereas TR α 1 stabilizes it and activates Wnt (Kress et al., 2009a; Plateroti et al., 2006). It is worth noting that TR α 1 and TR β 1 often play opposite roles (Cheng et al., 2010; Kress et al., 2009b), and differences in the cell context may explain the divergences observed in their functions.

3.3. Functional synergism

A growing body of evidence has emerged from different studies showing that the function of TH-TRs on the physiology of cells and tissues may depend on its synergy with other signals to trigger a context-specific proliferation or differentiation (rev. in Kress et al., 2009b). Indeed, the response of a cell to THs varies according to the cell type, its developmental state (progenitor or differentiated), its pathophysiological state (normal or tumour cell), and, finally, the cellular context. In the following section, we will present data clearly highlighting a synergistic interaction between TRs and the Wnt pathways, leading to the induction of specific cell responses. We will, also include studies that describe the TH/TR-dependent modulation of cell proliferation/differentiation through an action on Wnt targets, such as

Ccnd1 and *c-Myc*.

It is well known that thyroid status influences skin morphology and function (Paus, 2010), and it was shown that the topical application of TH triggers epidermal proliferation and dermal thickening and accelerates wound healing in rodents (Safer et al., 2005, 2001). Conversely, reduced cell proliferation has been reported in TR-deficient animals in correlation with strongly reduced *Ccnd1* levels of expression in the keratinocytes of the basal layer (Contreras-Jurado et al., 2011; rev. in Pascual and Aranda, 2013). It is worth noting that the basal cells of the epidermis express keratin 15 (K15), which is a marker of the reservoir stem cells of the follicle bulge. In these specific cells, the activation of β -catenin stimulates K15-positive stem cell proliferation and thus bulge expansion (rev. in Baker et al., 2010). Interestingly, the promoter of K15 contains a TRE and the gene is positively regulated by THs (Radoja et al., 2004), strongly suggesting that these stem cells could be sensitive to both TR and Wnt pathways.

The TR α 1 displays multilevel interactions with the canonical Wnt pathway in precursor cells of the intestinal epithelium, in order to control the balance between cell proliferation and cell differentiation (rev. in Sirakov et al., 2014). Indeed, liganded TR α 1 directly regulates the transcription of *Ctnnb1* and *Sfrp2*, on the one hand, and increased levels of sFRP2 stabilize β -catenin through a mechanism involving Fzd receptors, on the other (Kress et al., 2009a). Intriguingly, the *Jag1* gene, coding for the Notch receptor JAG1 (rev. in Fre et al., 2011), is directly regulated by both the canonical Wnt (Peignon et al., 2011; Rodilla et al., 2009) and TR α 1 (Sirakov et al., 2015) signals in the intestinal crypts. The direct regulation of the *Jag1* in both cases, is of particular interest, since it suggests alternative links and synergies between these three pathways, each of which play important roles in intestinal crypt progenitor and stem cell biology (Fre et al., 2009; Kress et al., 2008, 2009a). In addition, the action of TR α 1 on the activity of Notch also provides an explanation for the effect of TH-TRs on cell fate (Cvoro et al., 2015; Sirakov et al., 2015).

It is worth underlining that the TR α 1 receptor not only interacts at multiple levels with the canonical Wnt pathway in the precursor cells of the intestinal epithelium, but this interaction also takes place in pathologies, such as cancer (Kress et al., 2010; Sirakov et al., 2012). Indeed, owing to the importance of these interactions in physiological conditions, and considering the key role of altered Wnt signalling in gut

tumour development (rev. in Clevers and Batlle, 2006), we tested the hypothesis that TRα1 overexpression may trigger tumour development, by generating mice (*vil*-TRα1) overexpressing TRα1 in the intestinal epithelium (Kress et al., 2010). Our results revealed that TRα1 overexpression induced crypt hyperplasia and hyper-proliferation, but was not able to promote cancer development *per se*. Conversely, it cooperated with an activated Wnt canonical pathway in *vil*-TRα1/*Apc*^{+/^{1638N} mice, to induce a more aggressive tumour development and metastatic dissemination compared with the *Apc*^{+/^{1638N} mice (Kress et al., 2010). In an effort to define the mechanisms involved in this cooperation, we also reported that the TRα1/β-catenin/Tcf4 complex in *vil*-TRα1/*Apc*^{+/^{1638N} tumours resulted in the down-regulation of the TRα1 target genes and in the up-regulation of the Wnt targets (Sirakov et al., 2012). This latter effect is due to the recruitment of TRα1 to Wnt targets, as demonstrated by ChIP experiments on the *Axin2* and *c-Myc* promoter regions containing the Wnt-response elements (Sirakov et al., 2012).}}}

In some studies, a synergistic effect between TH-TRs and Wnt has not been directly established, but may be extrapolated from data on the modulation of Wnt target gene expression. Indeed, an example of cellular context in which THs *via* TRs activate proliferation and enhance *Ccnd1* expression is represented by the pancreatic β-cells, in which T3 acts as a survival factor protecting them from apoptosis (Furuya et al., 2010; Verga Falzacappa et al., 2006). In the liver, the proliferation induced by THs is not correlated with an increased expression of *c-Myc* (Leoni et al., 2011), but *Ccnd1* has been reported as an early target (Pibiri et al., 2001). An opposite effect has been reported for the regulation of *Ccnd1* and *c-Myc* by THs in the brain, where it is well-known that they play a complex role. Indeed, THs affect many cell types or brain regions at different developmental stages, and are involved in normal brain functions in the adult (rev. in Bernal, 2007). For instance, THs are crucial for regulating the development and maturation of the oligodendrocyte lineage (Fernandez et al., 2004). At an early stage in development, THs in close cooperation with platelet-derived growth factor (PDGF) induce oligodendrocyte precursors to exit the cell cycle and to initiate the differentiation program (Raff, 2006); in this case they negatively regulate proliferation and cell cycle controlling genes, including *Ccnd1* and *c-Myc* (Tokumoto et al., 2001). A similar negative regulation by THs has also been reported in the neuroblastoma N2Aβ cell line (Lebel et al., 1994; Perez-Juste et al., 2000). Moreover, it was shown that the expression of *c-Myc* and *Ccnd1* may be altered by T3 in neural progenitor cells present in the subventricular zone (SVZ) (Hassani et al., 2007; Lemkine et al., 2005; Lopez-Juarez et al., 2012), which along with the subgranular zone of dentate gyrus was shown *in vivo* to serve as a source of neural stem cells in the process of adult neurogenesis (rev. in Yamaguchi et al., 2016).

3.4. Role of the deiodinases in TH-TR and Wnt crosstalk

Finally, we would like to present studies analysing the function of deiodinases on tissue development and homeostasis, since these enzymes appear to be important modulators of the local availability of THs (Bianco and Kim, 2006), and thus of the activity of TRs. Indeed, a complex interplay between DIO2 (*i.e.* high cellular T3) or DIO3 (*i.e.* low cellular T3) and Wnt has been described in human colon cancer cell lines, which included cancer stem cells (Catalano et al., 2016; Dentice et al., 2012). Specifically, DIO2 is down- and DIO3 is up-regulated by Wnt signalling, resulting in decreased cellular levels of T3; these effects were accompanied by the alteration of the balance between cell proliferation and cell differentiation. These data, while of great interest, highlight differences when dealing with human colon cancer cells or normal precursor cells of the mouse intestinal epithelium (rev. in Sirakov et al., 2014). Even though a different biological status (*i.e.* physiological *vs* pathological condition) may account for this divergence, a more precise analysis focusing on the importance of the

DIOs on intestinal epithelial cells is greatly needed. Another study revealed the pivotal role of DIO2-dependent T3 synthesis in stimulating the proliferation of muscle precursor cells and in muscle regeneration (Dentice et al., 2010). In that specific work, however, the Wnt status was not investigated.

4. Conclusions

THs play pleiotropic functions in vertebrates, during developmental processes and in the maintenance of tissue homeostasis. The same assumption is true for the Wnt/β-catenin pathway. Interestingly, both signals are evolutionary conserved (Croce and McClay, 2008; Laudet, 2011) and most of their functions can be directly associated with a specific role in cell-cell signalling and in precursor cell biology (Clevers et al., 2014; Fernandez-Pernas et al., 2016; Milanesi et al., 2016; Sirakov et al., 2014). Indeed, the best-studied example, highlighting the importance of TH signalling, is the amphibian metamorphosis, during which THs behave as multi-tissue reprogramming factors: some organs are lost (*i.e.* gills), others undergo *de novo* formation (*i.e.* lung) or are remodelled (*i.e.* intestine), to permit the juvenile animal to acquire adult features and survive within a new environment (Tata, 2006). It is worth underlining that in most of the organs described as targets of the TH-TRs, including the nervous system, the bone, the heart, the skeletal muscle, the skin, the liver and the intestine (Pascual and Aranda, 2013), the Wnt/β-catenin pathway also plays a pivotal role (Inestrosa and Varela-Nallar, 2015; Krausova and Korinek, 2014; Zhong et al., 2014). Studies clearly demonstrated that the crosstalk between TH-TR and the Wnt is present at several levels, including the control of gene expression, physical interactions and functional synergism (Beildeck et al., 2010; D'Errico and Moschetta, 2008; Kim and Mohan, 2013; Mulholland et al., 2005; Sirakov et al., 2014). Of note, the TRα1 receptor not only interacts at multiple levels with the canonical Wnt pathway in precursor cells of the intestinal epithelium in order to control crypt proliferation and stem cell biology, but this interaction also takes place in pathological conditions (Kress et al., 2010; Sirakov et al., 2012). However, in other cellular contexts, such as liver or skin, this cooperation is not as clear, and THs can have different effects on cell proliferation and tumorigenesis (Pascual and Aranda, 2013).

The TRs are clearly potent regulators of proliferation and differentiation of many cell types (Kress et al., 2009b). Recent findings suggest that part of their actions could be correlated with the regulation of stem/progenitor cell function, both during development and in adulthood. This is of particular interest, since stem cells have unique functions in organ formation, maintenance and regeneration. Given the impact of the Wnt pathway on stem cell biology and on cancer development, this interplay with the TH-TR signal clearly represents an “intriguing liaison”, which has (i) a dark side, since it may play a role in the transformation of stem cells into cancer stem cells, and (ii) a light side, since it may be a key factor involved in stem cell amplification and differentiation, which could be exploited *in vitro* for regenerative medicine purposes. Thus, modulating TR-Wnt functionality could be beneficial for modifying the behaviour of cancer stem cells or of their associated niche cells refractory to chemo- and radio-therapy (Borah et al., 2015; Skvortsova et al., 2015). Furthermore, this “liaison” can also be used to optimize culture conditions of progenitor/stem cells suitable for cell amplification and transplantation (Fernandez-Pernas et al., 2016; Lee et al., 2010).

Acknowledgements

We are grateful to Brigitte Manship for the critical reading of the manuscript.

The work in the Plateroti lab is supported by Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (Grant no. PGA1201402000834) and by the Département du Rhône de la Ligue Contre le Cancer (Grant no.

137838). JU received support by the Ligue Nationale contre le cancer and the Fondation ARC.

References

- Abe, S., Namba, N., Abe, M., Fujiwara, M., Aikawa, T., Kogo, M., Ozono, K., 2012. Monocarboxylate transporter 10 functions as a thyroid hormone transporter in chondrocytes. *Endocrinology* 153, 4049–4058.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R., 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–3804.
- Abuid, J., Larsen, P.R., 1974. Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism. Comparison of the acute changes during therapy with antithyroid agents. *J. Clin. Investig.* 54, 201–208.
- Alfaro, M.P., Vincent, A., Saraswati, S., Thorne, C.A., Hong, C.C., Lee, E., Young, P.P., 2010. sFRP2 suppression of bone morphogenic protein (BMP) and Wnt signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair. *J. Biol. Chem.* 285, 35645–35653.
- Amir, A.L., Barua, M., McKnight, N.C., Cheng, S., Yuan, X., Balk, S.P., 2003. A direct beta-catenin-independent interaction between androgen receptor and T cell factor 4. *J. Biol. Chem.* 278, 30828–30834.
- Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P.W., Yaniv, A., Aaronson, S.A., 1999. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 16180–16187.
- Baker, C.M., Verstuyf, A., Jensen, K.B., Watt, F.M., 2010. Differential sensitivity of epidermal cell subpopulations to beta-catenin-induced ectopic hair follicle formation. *Dev. Biol.* 343, 40–50.
- Baker, N.E., 1988. Transcription of the segment-polarity gene *wingless* in the imaginal discs of *Drosophila*, and the phenotype of a pupal-lethal *wg* mutation. *Development* 102, 489–497.
- Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., 1993. Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8832–8836.
- Bassett, J.H., Harvey, C.B., Williams, G.R., 2003. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol. Cell Endocrinol.* 213, 1–11.
- Beildeck, M.E., Gelmann, E.P., Byers, S.W., 2010. Cross-regulation of signaling pathways: an example of nuclear hormone receptors and the canonical Wnt pathway. *Exp. Cell Res.* 316, 1763–1772.
- Bernal, J., 2007. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3, 249–259.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R., 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a wingless receptor. *Nature* 382, 225–230.
- Bianco, A.C., Kim, B.W., 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Investig.* 116, 2571–2579.
- Bodenner, D.L., Mroczynski, M.A., Weintraub, B.D., Radovick, S., Wondisford, F.E., 1991. A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *J. Biol. Chem.* 266, 21666–21673.
- Borah, A., Raveendran, S., Rochani, A., Maekawa, T., Kumar, D.S., 2015. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis* 4, e177.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J., 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* 121, 737–746.
- Brown, A.R., Simmen, R.C., Simmen, F.A., 2013. The role of thyroid hormone signaling in the prevention of digestive system cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16240–16257.
- Buchholz, D.R., Heimeier, R.A., Das, B., Washington, T., Shi, Y.B., 2007. Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues. *Dev. Biol.* 303, 576–590.
- Cain, C.J., Manilay, J.O., 2013. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies. *Exp. Hematol.* 41 (1), 3–16.
- Catalano, V., Dentice, M., Ambrosio, R., Luongo, C., Carollo, R., Benfante, A., Todaro, M., Stassi, G., Salvatore, D., 2016. Activated Thyroid Hormone Promotes Differentiation And Chemotherapeutic Sensitization Of Colorectal Cancer Stem Cells By Regulating Wnt and BMP4 signaling. *Cancer Res.* 76, 1237–1244.
- Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., Bejsovec, A., 1998. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress wingless signalling activity. *Nature* 395, 604–608.
- Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., Samarut, J., 1997. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the *c-erbA* alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol. Endocrinol.* 11, 1278–1290.
- Chatonnet, F., Guyot, R., Benoit, G., Flamant, F., 2013. Genome-wide analysis of thyroid hormone receptors shared and specific functions in neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E766–E775.
- Chatterjee, V.K., Lee, J.K., Rentoumis, A., Jameson, J.L., 1989. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9114–9118.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nusse, R., Lefkowitz, R.J., 2003. Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301, 1391–1394.
- Cheng, S.Y., 2000. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 1, 9–18.
- Cheng, S.Y., Leonard, J.L., Davis, P.J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* 31, 139–170.
- Cheng, Y.Y., Yu, J., Wong, Y.P., Man, E.P., To, K.F., Jin, V.X., Li, J., Tao, Q., Sung, J.J., Chan, F.K., Leung, W.K., 2007. Frequent epigenetic inactivation of secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) by promoter methylation in human gastric cancer. *Br. J. Cancer* 97, 895–901.
- Chi, H.C., Liao, C.H., Huang, Y.H., Wu, S.M., Tsai, C.Y., Liao, C.J., Tseng, Y.H., Lin, Y.H., Chen, C.Y., Chung, I.H., Wu, T.L., Chen, W.J., Lin, K.H., 2013. Thyroid hormone receptor inhibits hepatoma cell migration through transcriptional activation of Dickkopf 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439, 60–65.
- Cianferotti, L., Cox, M., Skorja, K., Demay, M.B., 2007. Vitamin D receptor is essential for normal keratinocyte stem cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9428–9433.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480.
- Clevers, H., Loh, K.M., Nusse, R., 2014. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* 346, 1248012.
- Contreras-Jurado, C., Garcia-Serrano, L., Gomez-Ferreria, M., Costa, C., Paramio, J.M., Aranda, A., 2011. The thyroid hormone receptors as modulators of skin proliferation and inflammation. *J. Biol. Chem.* 286, 24079–24088.
- Croce, J.C., McClay, D.R., 2008. Evolution of the Wnt pathways. *Methods Mol. Biol.* 469, 3–18.
- Cruciat, C.M., Niehrs, C., 2013. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a015081.
- Cvoro, A., Devito, L., Milton, F.A., Noli, L., Zhang, A., Filippi, C., Sakai, K., Suh, J.H., D, H.S., Dhanan, A., Sakai, T., Illic, D., Webb, P., 2015. A thyroid hormone receptor/KLF9 axis in human hepatocytes and pluripotent stem cells. *Stem Cells* 33, 416–428.
- D'Errico, I., Moschetta, A., 2008. Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1523–1543.
- DasGupta, R., Fuchs, E., 1999. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* 126, 4557–4568.
- Davis, P.J., Leonard, J.L., Davis, F.B., 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 211–218.
- Davis, P.J., Davis, F.B., Mousa, S.A., Luidens, M.K., Lin, H.Y., 2011. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* 51, 99–115.
- de Lau, W.B., Snel, B., Clevers, H.C., 2012. The R-spondin protein family. *Genome Biol.* 13 (3), 242–252.
- Deb, A., Davis, B.H., Guo, J., Ni, A., Huang, J., Zhang, Z., Mu, H., Dzau, V.J., 2008. SFRP2 regulates cardiomyogenic differentiation by inhibiting a positive transcriptional autoregulatory loop of Wnt3a. *Stem Cells* 26, 35–44.
- Dentice, M., Marsili, A., Ambrosio, R., Guardiola, O., Sibilio, A., Paik, J.H., Minchiotti, G., DePinho, R.A., Fenzi, G., Larsen, P.R., Salvatore, D., 2010. The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. *J. Clin. Investig.* 120, 4021–4030.
- Dentice, M., Luongo, C., Ambrosio, R., Sibilio, A., Casillo, A., Iaccarino, A., Troncone, G., Fenzi, G., Larsen, P.R., Salvatore, D., 2012. Beta-Catenin regulates deiodinase levels and thyroid hormone signaling in colon cancer cells. *Gastroenterology* 143, 1037–1047.
- Descamps, S., Arzouk, H., Bacou, F., Bernardi, H., Fedon, Y., Gay, S., Reyne, Y., Rossano, B., Levin, J., 2008. Inhibition of myoblast differentiation by Sfrp1 and Sfrp2. *Cell Tissue Res.* 332, 299–306.
- Dijksterhuis, J.P., Petersen, J., Schulte, G., 2014. WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance. *IUPHAR Review* 3. *Br. J. Pharm.* 171, 1195–1209.
- Dumitrescu, A.M., Liao, X.H., Weiss, R.E., Millen, K., Refetoff, S., 2006. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* 147, 4036–4043.
- Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin, Byers, S., 1999. Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr. Biol.* 9, 1415–1418.
- El-Tanani, M., Fernig, D.G., Barraclough, R., Green, C., Rudland, P., 2001. Differential modulation of transcriptional activity of estrogen receptors by direct protein-protein interactions with the T cell factor family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 276, 41675–41682.
- Fanti, M., Singh, S., Ledda-Columbano, G.M., Columbano, A., Monga, S.P., 2014. Triiodothyronine induces hepatocyte proliferation by protein kinase A-dependent beta-catenin activation in rodents. *Hepatology* 59, 2309–2320.
- Fernandez, M., Pironi, S., Manservigi, M., Giardino, L., Calza, L., 2004. Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2059–2070.
- Fernandez-Pernas, P., Fafian-Labora, J., Lesende-Rodriguez, I., Mateos, J., De la Fuente, A., Fuentes, I., De Toro Santos, J., Blanco Garcia, F., Arufe, M.C., 2016. 3, 3', 5'-triiodo-L-thyronine increases in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells from human umbilical cord stroma through SRC2. *J. Cell Biochem.* 117, 2097–2108.
- Finch, P.W., He, X., Kelley, M.J., Uren, A., Schaudies, R.P., Popescu, N.C., Rudikoff, S., Aaronson, S.A., Varmus, H.E., Rubin, J.S., 1997. Purification and molecular cloning of a secreted, frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6770–6775.
- Flamant, F., Samarut, J., 2003. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and

- knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 85–90.
- Frau, C., Loi, R., Petrelli, A., Perra, A., Menegon, S., Kowalik, M.A., Pinna, S., Leoni, V.P., Fornari, F., Gramantieri, L., Ledda-Columbano, G.M., Giordano, S., Columbano, A., 2015. Local hypothyroidism favors the progression of preneoplastic lesions to hepatocellular carcinoma in rats. *Hepatology* 61, 249–259.
- Fre, S., Pallavi, S.K., Huyghe, M., Lae, M., Janssen, K.P., Robine, S., Artavanis-Tsakonas, S., Louvard, D., 2009. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6309–6314.
- Fre, S., Bardin, A., Robine, S., Louvard, D., 2011. Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse. *Exp. Cell Res.* 317, 2740–2747.
- Friesema, E.C., Docter, R., Moerings, E.P., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Krenning, E.P., Hennemann, G., Visser, T.J., 1999. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 497–501.
- Friesema, E.C., Grueters, A., Biebermann, H., Krude, H., von Moers, A., Reeser, M., Barrett, T.G., Mancilla, E.E., Svensson, J., Kester, M.H., Kuiper, G.G., Balkassmi, S., Uitterlinden, A.G., Koehle, J., Rodien, P., Halestrap, A.P., Visser, T.J., 2004. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 364, 1435–1437.
- Furuya, F., Shimura, H., Yamashita, S., Endo, T., Kobayashi, T., 2010. Liganded thyroid hormone receptor-alpha enhances proliferation of pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 285, 24477–24486.
- Guigon, C.J., Zhao, L., Lu, C., Willingham, M.C., Cheng, S.Y., 2008. Regulation of beta-catenin by a novel nongenomic action of thyroid hormone beta receptor. *Mol. Cell Biol.* 28, 4598–4608.
- Guigon, C.J., Kim, D.W., Zhu, X., Zhao, L., Cheng, S.Y., 2010. Tumor suppressor action of liganded thyroid hormone receptor beta by direct repression of beta-catenin gene expression. *Endocrinology* 151, 5528–5536.
- Hadzic, E., Desai-Yajnik, V., Helmer, E., Guo, S., Wu, S., Koudinova, N., Casanova, J., Raaka, B.M., Samuels, H.H., 1995. A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. *Mol. Cell Biol.* 15, 4507–4517.
- Hagenbuch, B., 2007. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 209–221.
- Hasebe, T., Fujimoto, K., Kajita, M., Ishizuya-Oka, A., 2016. Thyroid hormone activates Wnt/beta-catenin signaling involved in adult epithelial development during intestinal remodeling in *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 365, 309–318.
- Hassani, Z., Francois, J.C., Alfama, G., Dubois, G.M., Paris, M., Giovannangeli, C., Demeneix, B.A., 2007. A hybrid CMV-H1 construct improves efficiency of PEI-delivered shRNA in the mouse brain. *Nucleic Acids Res.* 35, e65.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.
- Herz, J., Chen, Y., Masiulis, I., Zhou, L., 2009. Expanding functions of lipoprotein receptors. *J. Lipid Res.* 50 (Suppl), S287–292.
- Hollenberg, A.N., Monden, T., Flynn, T.R., Boers, M.E., Cohen, O., Wondisford, F.E., 1995. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol. Endocrinol.* 9, 540–550.
- Huang, Z., Li, L., Wang, J., 2007. Hypermethylation of SFRP2 as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer and precancerous lesions. *Dig. Dis. Sci.* 52, 2287–2291.
- Hurlstone, A., Clevers, H., 2002. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.* 21, 2303–2311.
- Inestrosa, N.C., Varela-Nallar, L., 2015. Wnt signalling in neuronal differentiation and development. *Cell Tissue Res.* 359, 215–223.
- Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T., Buchholz, D.R., Kajita, M., Fu, L., Shi, Y.B., 2009. Origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *FASEB J.* 23, 2568–2575.
- Ito, M., Toyoda, N., Nomura, E., Takamura, Y., Amino, N., Iwasaka, T., Takamatsu, J., Miyachi, A., Nishikawa, M., 2011. Type 1 and type 2 iodothyronine deiodinases in the thyroid gland of patients with 3,5,3'-triiodothyronine-predominant Graves' disease. *Eur. J. Endocrinol.* 164, 95–100.
- Jakobs, T.C., Schmutzler, C., Meissner, J., Kohrle, J., 1997. The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene-mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element. *Eur. J. Biochem.* 247, 288–297.
- Jansen, J., Friesema, E.C., Milici, C., Visser, T.J., 2005. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15, 757–768.
- Jansson, E.A., Are, A., Greicius, G., Kuo, I.C., Kelly, D., Arulampalam, V., Pettersson, S., 2005. The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1460–1465.
- Judelson, C., Privalsky, M.L., 1996. DNA recognition by normal and oncogenic thyroid hormone receptors. Unexpected diversity in half-site specificity controlled by non-zinc-finger determinants. *J. Biol. Chem.* 271, 10800–10805.
- Kawano, Y., Kypa, R., 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* 116, 2627–2634.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., Matsumoto, S., 2011. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 291, 21–71.
- Kim, H.Y., Mohan, S., 2013. Role and mechanisms of actions of thyroid hormone on the skeletal development. *Bone Res.* 1, 146–161.
- Kinne, A., Schulein, R., Krause, G., 2011. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res.* 4 (Suppl 1), S7.
- Ko, J., Ryu, K.S., Lee, Y.H., Na, D.S., Kim, Y.S., Oh, Y.M., Kim, I.S., Kim, J.W., 2002. Human secreted frizzled-related protein is down-regulated and induces apoptosis in human cervical cancer. *Exp. Cell Res.* 280, 280–287.
- Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W., Moore, D.D., 1989. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337, 659–661.
- Kowalik, M.A., Perra, A., Pibiri, M., Cocco, M.T., Samarut, J., Plateroti, M., Ledda-Columbano, G.M., Columbano, A., 2010. TRbeta is the critical thyroid hormone receptor isoform in T3-induced proliferation of hepatocytes and pancreatic acinar cells. *J. Hepatol.* 53, 686–692.
- Krausova, M., Korinek, V., 2014. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal* 26, 570–579.
- Kress, E., Rezza, A., Nadjar, J., Samarut, J., Plateroti, M., 2008. The thyroid hormone receptor-alpha (TRalpha) gene encoding TRalpha1 controls deoxyribonucleic acid damage-induced tissue repair. *Mol. Endocrinol.* 22, 47–55.
- Kress, E., Rezza, A., Nadjar, J., Samarut, J., Plateroti, M., 2009a. The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor alpha1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *J. Biol. Chem.* 284, 1234–1241.
- Kress, E., Samarut, J., Plateroti, M., 2009b. Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Mol. Cell Endocrinol.* 313, 36–49.
- Kress, E., Skah, S., Sirakov, M., Nadjar, J., Gadot, N., Scoazec, J.Y., Samarut, J., Plateroti, M., 2010. Cooperation between the thyroid hormone receptor TRalpha1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 138, 1863–1874.
- Laudet, V., 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 207–226.
- Laudet, V., 2011. The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr. Biol.* 21, R726–R737.
- Laurberg, P., Vestergaard, H., Nielsen, S., Christensen, S.E., Seefeldt, T., Helleberg, K., Pedersen, K.M., 2007. Sources of circulating 3,5,3'-triiodothyronine in hyperthyroidism estimated after blocking of type 1 and type 2 iodothyronine deiodinases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 2149–2156.
- Lebel, J.M., Dussault, J.H., Puymirat, J., 1994. Overexpression of the beta-1 thyroid receptor induces differentiation in Neuro-2a cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2644–2648.
- Lee, J.L., Lin, C.T., Chueh, L.L., Chang, C.J., 2004. Autocrine/paracrine secreted frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis – a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 14602–14609.
- Lee, Y.K., Ng, K.M., Chan, Y.C., Lai, W.H., Au, K.W., Ho, C.Y.J., Wong, L.Y., Lau, C.P., Tse, H.F., Siu, C.W., 2010. Triiodothyronine promotes cardiac differentiation and maturation of embryonic stem cells via the classical genomic pathway. *Mol. Endocrinol.* 24, 1728–1736.
- Lemkine, G.F., Raji, A., Alfama, G., Turque, N., Hassani, Z., Alegria-Prevot, O., Samarut, J., Levi, G., Demeneix, B.A., 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J.* 19, 863, (+).
- Leoni, V.P., Ledda-Columbano, G.M., Pibiri, M., Saliba, C., Perra, A., Kowalik, M.A., Grober, O.M.V., Ravo, M., Weisz, A., Locker, J., Ghiso, E., Giordano, S., Columbano, A., 2011. Expression of c-jun is not mandatory for mouse hepatocyte proliferation induced by two nuclear receptor ligands: TCPOBOP and T3. *J. Hepatol.* 55, 1069–1078.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., DeRobertis, E.M., 1997. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747–756.
- Liao, C.H., Yeh, C.T., Huang, Y.H., Wu, S.M., Chi, H.C., Tsai, M.M., Tsai, C.Y., Liao, C.J., Tseng, Y.H., Lin, Y.H., Chen, C.Y., Chung, I.H., Cheng, W.L., Chen, W.J., Lin, K.H., 2012. Dickkopf 4 positively regulated by the thyroid hormone receptor suppresses cell invasion in human hepatoma cells. *Hepatology* 55, 910–920.
- Liu, C.M., Li, Y.M., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z.H., Lin, X.H., He, X., 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837–847.
- Lonard, D.M., O'Malley, B.W., 2007. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executors of cellular regulation. *Mol. Cell* 27, 691–700.
- Lopez-Juarez, A., Remaud, S., Hassani, Z., Jolivet, P., Simons, J.P., Sontag, T., Yoshikawa, K., Price, J., Morvan-Dubois, G., Demeneix, B.A., 2012. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* 10, 531–543.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.
- Melkonyan, H.S., Chang, W.C., Shapiro, J.P., Mahadevappa, M., Fitzpatrick, P.A., Kiefer, M.C., Tomei, L.D., Umansky, S.R., 1997. SARP: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13636–13641.
- Mii, Y., Taira, M., 2009. Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* 136, 4083–4088.
- Milanesi, A., Lee, J.W., Kim, N.H., Liu, Y.Y., Yang, A., Sedrakyan, S., Kahng, A., Cervantes, V., Tripuraneni, N., Cheng, S.Y., Perin, L., Brent, G.A., 2016. Thyroid hormone receptor alpha plays an essential role in male skeletal muscle myoblast proliferation, differentiation, and response to injury. *Endocrinology* 157, 4–15.
- Miller, J.R., 2002. The Wnts. *Genome Biol.* 3, (REVIEWS3001).
- Mitchell, A.M., Tom, M., Mortimer, R.H., 2005. Thyroid hormone export from cells: contribution of P-glycoprotein. *J. Endocrinol.* 185, 93–98.
- Mitsuhashi, T., Tennyson, G.E., Nikodem, V.M., 1988. Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5804–5808.
- Montcouquiol, M., Crenshaw, E.B., 3rd, Kelley, M.W., 2006. Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 363–386.
- Morello, R., Bertin, T.K., Schlaubit, S., Shaw, C.A., Kakuru, S., Munivez, E., Hermans, P., Chen, Y., Zabel, B., Lee, B., 2008. Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. *J. Cell Physiol.* 217, 127–137.

- Mulholland, D.J., Dedhar, S., Coetzee, G.A., Nelson, C.C., 2005. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr. Rev.* 26, 898–915.
- Muller, J., Mayerl, S., Visser, T.J., Darras, V.M., Boelen, A., Frappart, L., Mariotta, L., Verrey, F., Heuer, H., 2014. Tissue-specific alterations in thyroid hormone homeostasis in combined Mct10 and Mct8 deficiency. *Endocrinology* 155, 315–325.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M., 1989. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul.* 1, 37–44.
- Nam, J.S., Turcotte, T.J., Smith, P.F., Choi, S., Yoon, J.K., 2006. Mouse crin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 13247–13257.
- O'Shea, P.J., Kim, D.W., Logan, J.G., Davis, S., Walker, R.L., Meltzer, P.S., Cheng, S.Y., Williams, G.R., 2012. Advanced bone formation in mice with a dominant-negative mutation in the thyroid hormone receptor beta gene due to activation of Wnt/beta-catenin protein signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 17812–17822.
- Oberste-Berghaus, C., Zanger, K., Hashimoto, K., Cohen, R.N., Hollenberg, A.N., Wondisford, F.E., 2000. Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators. *J. Biol. Chem.* 275, 1787–1792.
- Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R., 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* 8, 1711–1717.
- Palmer, H.G., Gonzalez-Sancho, J.M., Espada, J., Berciano, M.T., Puig, I., Baulida, J., Quintanilla, M., Cano, A., de Herrerros, A.G., Lafarga, M., Munoz, A., 2001. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154, 369–387.
- Pascual, A., Aranda, A., 2013. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3908–3916.
- Paus, R., 2010. Exploring the "thyroid-skin connection": concepts, questions, and clinical relevance. *J. Invest. Dermatol.* 130, 7–10.
- Peignon, G., Durand, A., Cacheux, W., Ayrault, O., Terris, B., Laurent-Puig, P., Shroyer, N.F., Van Seuningen, I., Honjo, T., Perret, C., Romagnolo, B., 2011. Complex interplay between beta-catenin signalling and Notch effectors in intestinal tumorigenesis. *Gut* 60, 166–176.
- Perez-Juste, G., Garcia-Silva, S., Aranda, A., 2000. An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 275, 1307–1314.
- Perra, A., Plateroti, M., Columbano, A., 2016. T3/TRs axis in hepatocellular carcinoma: new concepts for an old pair. *Endocr. Relat. Cancer* 23, R353–R369.
- Pibiri, M., Ledda-Columbano, G.M., Cossu, C., Simbula, G., Menegazzi, M., Shinozuka, H., Columbano, A., 2001. Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). *FASEB J.* 15, 1006–1013.
- Plateroti, M., Kress, E., Mori, J.I., Samarut, J., 2006. Thyroid hormone receptor alpha directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 26, 3204–3214.
- Radoja, N., Stojadinovic, O., Waseem, A., Tomic-Canic, M., Milisavljevic, V., Teebor, S., Blumenberg, M., 2004. Thyroid hormones and gamma interferon specifically increase K15 keratin gene transcription. *Mol. Cell Biol.* 24, 3168–3179.
- Raff, M., 2006. The mystery of intracellular developmental programmes and timers. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 663–670.
- Rodilla, V., Villanueva, A., Obrador-Hevia, A., Robert-Moreno, A., Fernandez-Majada, V., Grilli, A., Lopez-Bigas, N., Bellora, N., Alba, M.M., Torres, F., Dunach, M., Sanjuan, X., Gonzalez, S., Gridley, T., Capella, G., Bigas, A., Espinosa, L., 2009. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6315–6320.
- Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J.M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C., Bovolenta, P., 2005. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat. Neurosci.* 8, 1301–1309.
- Safer, J.D., Fraser, L.M., Ray, S., Holick, M.F., 2001. Topical triiodothyronine stimulates epidermal proliferation, dermal thickening, and hair growth in mice and rats. *Thyroid* 11, 717–724.
- Safer, J.D., Crawford, T.M., Holick, M.F., 2005. Topical thyroid hormone accelerates wound healing in mice. *Endocrinology* 146, 4425–4430.
- Salic, A.N., Kroll, K.L., Evans, L.M., Kirschner, M.W., 1997. Sizzled: a secreted Xwnt8 antagonist expressed in the ventral marginal zone of *Xenopus* embryos. *Development* 124, 4739–4748.
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., Vennstrom, B., 1986. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635–640.
- Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S., Shimono, A., 2006. Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133, 989–999.
- Semenov, M.V., Habas, R., Macdonald, B.T., He, X., 2007. SnapShot: noncanonical Wnt signaling pathways. *Cell* 131, 1378.
- Shah, S., Islam, M.N., Dakshanamurthy, S., Rizvi, I., Rao, M., Herrell, R., Zinser, G., Valrance, M., Aranda, A., Moras, D., Norman, A., Welsh, J., Byers, S.W., 2006. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin cross-regulation. *Mol. Cell* 21, 799–809.
- Sinha, R.A., Singh, B.K., Yen, P.M., 2014. Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 538–545.
- Sirakov, M., Skah, S., Lone, L.N., Nadjar, J., Angelov, D., Plateroti, M., 2012. Multi-level interactions between the nuclear receptor TRalpha1 and the WNT effectors beta-catenin/Tcf4 in the intestinal epithelium. *PLoS One* 7, e34162.
- Sirakov, M., Kress, E., Nadjar, J., Plateroti, M., 2014. Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? *Cell Mol. Life Sci.* 71, 2897–2907.
- Sirakov, M., Boussouar, A., Kress, E., Frau, C., Lone, I.N., Nadjar, J., Angelov, D., Plateroti, M., 2015. The thyroid hormone nuclear receptor TRalpha1 controls the Notch signaling pathway and cell fate in murine intestine. *Development* 142, 2764–2774.
- Skah, S., Nadjar, J., Sirakov, M., Plateroti, M., 2015. The secreted Frizzled-related protein 2 modulates cell fate and the Wnt pathway in the murine intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* 330, 56–65.
- Skvortsova, I., Debbage, P., Kumar, V., Slwortsov, S., 2015. Radiation resistance: cancer stem cells (CSCs) and their enigmatic pro-survival signaling. *Semin. Cancer Biol.* 35, 39–44.
- Smolich, B.D., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Papkoff, J., 1993. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol. Biol. Cell* 4, 1267–1275.
- Song, L.N., Herrell, R., Byers, S., Shah, S., Wilson, E.M., Gelmann, E.P., 2003. Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.* 23, 1674–1687.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Bin, Y. a.n.g., Akiyama, Y., van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., Baylin, S.B., 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 36, 417–422.
- Tagami, T., Madison, L.D., Nagaya, T., Jameson, J.L., 1997. Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol. Cell Biol.* 17, 2642–2648.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., He, X., 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530–535.
- Tanaka, K., Kitagawa, Y., Kadowaki, T., 2002. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277, 12816–12823.
- Tata, J.R., 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol. Cell Endocrinol.* 246, 10–20.
- Tetsu, O., McCormick, F., 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–426.
- Tokumoto, Y.M., Tang, D.G., Raff, M.C., 2001. Two molecularly distinct intracellular pathways to oligodendrocyte differentiation: role of a p53 family protein. *EMBO J.* 20, 5261–5268.
- Toyoda, N., Zavacki, A.M., Maia, A.L., Harney, J.W., Larsen, P.R., 1995. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol. Cell Biol.* 15, 5100–5112.
- Trajkovic, M., Visser, T.J., Mittag, J., Horn, S., Lukas, J., Darras, V.M., Raivich, G., Bauer, K., Heuer, H., 2007. Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J. Clin. Invest.* 117, 627–635.
- Tsourdji, E., Rijntjes, E., Kohrle, J., Hofbauer, L.C., Rauner, M., 2015. Hyperthyroidism and hypothyroidism in male mice and their effects on bone mass, bone turnover, and the Wnt inhibitors sclerostin and Dickkopf-1. *Endocrinology* 156, 3517–3527.
- Tu, H.M., Legrand, G., Bartha, T., Salvatore, D., Lechan, R.M., Larsen, P.R., 1999. Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 140, 784–790.
- van Amerongen, R., Mikels, A., Nusse, R., 2008. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci. Signal* 1, (re9).
- van der Deure, W.M., Peeters, R.P., Visser, T.J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 1–11.
- Verga Falzacappa, C., Panacchia, L., Bucci, B., Stigliano, A., Cavallo, M.G., Brunetti, E., Toscano, V., Misiti, S., 2006. 3,5,3'-triiodothyronine (T3) is a survival factor for pancreatic beta-cells undergoing apoptosis. *J. Cell Physiol.* 206, 309–321.
- Visser, W.E., Wong, W.S., van Mullen, A.A., Friesema, E.C., Geyer, J., Visser, T.J., 2010. Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol. Cell Endocrinol.* 315, 138–145.
- Visser, W.E., Friesema, E.C., Visser, T.J., 2011. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol. Endocrinol.* 25, 1–14.
- von Marschall, Z., Fisher, L.W., 2010. Secreted frizzled-related protein-2 (sFRP2) augments canonical Wnt3a-induced signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 299–304.
- Wagner, M.S., Wajner, S.M., Dora, J.M., Maia, A.L., 2007. Regulation of Dio2 gene expression by thyroid hormones in normal and type 1 deiodinase-deficient C3H mice. *J. Endocrinol.* 193, 435–444.
- Wagner, R.L., Apreletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D., Fletcher, R.J., 1995. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378, 690–697.
- Wang, L., Shao, Y.Y., Ballock, R.T., 2009. Carboxypeptidase Z (CPZ) links thyroid hormone and Wnt signaling pathways in growth plate chondrocytes. *J. Bone Min. Res.* 24, 265–273.
- Wang, L., Shao, Y.Y., Ballock, R.T., 2010. Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of beta-catenin signaling. *J. Bone Min. Res.* 25, 1138–1146.
- Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., Moos, M., Jr., 1997. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 88, 757–766.
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., Evans, R.M., 1986. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641–646.
- Willert, K., Nusse, R., 2012. Wnt proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007864.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates,

- J.R., 3rd, Nusse, R., 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448–452.
- Williams, G.R., Harney, J.W., Forman, B.M., Samuels, H.H., Brent, G.A., 1991. Oligomeric binding of T3 receptor is required for maximal T3 response. *J. Biol. Chem.* 266, 19636–19644.
- Wirth, E.K., Roth, S., Blechschmidt, C., Holter, S.M., Becker, L., Racz, I., Zimmer, A., Klopstock, T., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Wurst, W., Naumann, T., Brauer, A., de Angelis, M.H., Kohrle, J., Gruters, A., Schweizer, U., 2009. Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J. Neurosci.* 29, 9439–9449.
- Wondisford, F.E., 2004. Lessons learned from TR-beta mutant mice. In: Beck-Peccoz, P. (Ed.), *Syndromes of Hormone Resistance on the Hypothalamic-Pituitary-thyroid Axis*. Kluwer Academic Publishers, Uttar Pradesh, India, 109–118.
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M.W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., Nathans, J., 2004. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116, 883–895.
- Yamaguchi, M., Seki, T., Imayoshi, I., Tamamaki, N., Hayashi, Y., Tatebayashi, Y., Hitoshi, S., 2016. Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J. Physiol. Sci.* 66, 197–206.
- Yamamura, S., Kawakami, K., Hirata, H., Ueno, K., Saini, S., Majid, S., Dahiya, R., 2010. Oncogenic functions of secreted frizzled-related protein 2 in human renal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1680–1687.
- Yen, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81, 1097–1142.
- Yu, F., Gothe, S., Wikstrom, L., Forrest, D., Vennstrom, B., Larsson, L., 2000. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1545–R1554.
- Zavacki, A.M., Ying, H., Christoffolete, M.A., Aerts, G., So, E., Harney, J.W., Cheng, S.Y., Larsen, P.R., Bianco, A.C., 2005. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. *Endocrinology* 146, 1568–1575.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., He, X., 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877.
- Zhang, X.K., Kahl, M., 1993. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 4, 156–162.
- Zhong, Z., Ethen, N.J., Williams, B.O., 2014. WNT signaling in bone development and homeostasis. *Wiley Inter. Rev. Dev. Biol.* 3, 489–500.
- Zhou, Z., Wang, J., Han, X., Zhou, J., Linder, S., 1998. Up-regulation of human secreted frizzled homolog in apoptosis and its down-regulation in breast tumors. *Int. J. Cancer* 78, 95–99.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Analyse moléculaire de l'impact de TRα1 dans la tumorigenèse intestinale

A) TRα1, un régulateur de la voie Wnt/β-caténine

La voie des hormones thyroïdiennes et la voie Wnt sont étroitement liées étant donné leurs implications dans le développement de l'intestin. Par ailleurs, l'équipe a montré que chez la souris, l'hypothyroïdie diminue l'expression de la β-caténine tandis que l'hyperthyroïdie augmente son expression (Plateroti et al., 2006). Il est important de rappeler que la β-caténine est un acteur clé de la voie Wnt/β-caténine. De plus, grâce à l'utilisation de souris KO pour le gène codant pour *Thrb* ou *Thra*, il a été révélé que la régulation de la β-caténine par les HTs dépend spécifiquement de TRα1 (Plateroti et al., 2006). Par ailleurs, une analyse *in silico* a décrit la présence de sites TRE dans l'intron 1 du gène de la β-caténine. L'équipe a confirmé par la suite la capacité de TRα1 à se fixer sur ces sites introniques grâce à des expériences de précipitation de chromatine (Plateroti et al., 2006). D'autre part, des analyses *in vivo* et *in vitro* ont montré que *Sfrp2* peut être régulé au niveau transcriptionnel par TRα1, dévoilant un autre niveau d'interaction entre TRα1 et la voie Wnt (Kress et al., 2009). Il faut rappeler que sFRP2 est considéré comme un activateur de la voie Wnt, au contraire d'autres protéines sFRPs qui sont plutôt considérées comme des inhibitrices de cette voie (Kress et al., 2009; Skah et al., 2015).

Une coopération entre l'axe HT-TRα1 et la voie Wnt a été mise en évidence lorsque des souris surexprimant l'ADNc de TRα1 dans l'épithélium intestinal (souris *vil-TRα1*) ont été croisées avec des souris *Apc^{1638N/+}*. Ces dernières sont prédisposées à développer des polyps et adénocarcinomes dans l'intestin dû à l'activation de la voie Wnt. Cette étude a démontré que la surexpression de TRα1 accélère la carcinogenèse et augmente l'expression de gènes cibles de la voie Wnt dans l'intestin. C'est dans le but d'étudier les mécanismes de cette accélération dépendante de la surexpression de TRα1 qu'une analyse transcriptomique a été réalisée à partir de tissus sains et tumoraux de souris *Apc^{1638N/+}* et *vil-TRα1/Apc^{1638N/+}*.

Cette analyse nous a permis d'établir que la surexpression de TR α 1 dans un contexte tumoral approprié, a pour conséquence l'apparition d'un nombre important de gènes différentiellement régulés. Grâce à cette analyse nous avons pu dévoiler un nouveau mécanisme à travers lequel TR α 1 peut influencer la progression tumorale.

B) Wif1, une cible de TR α 1

En regardant plus en détail parmi les gènes impliqués dans la voie Wnt, nous avons remarqué que *Wif1*, un inhibiteur de la voie Wnt, était fortement réprimé après surexpression de TR α 1. Nous avons validé ces données par RT-qPCR et montré que cette même corrélation était présente dans des tumeurs de souris TR $\alpha^{0/0}$ /Apc^{1638N/+} (souris qui nécessitent un temps plus long pour développer des tumeurs et qui développent un plus faible nombre de tumeurs comparés aux simples mutants Apc^{1638N/+}) ; puisqu'en absence de TR α 1, l'expression de *Wif1* était augmentée par rapport aux tumeurs de souris *vil*-TR α 1/Apc^{1638N/+}. Ces résultats étaient particulièrement intéressants puisque selon la littérature, *Wif1* est hyperméthylé et donc réprimé dans les cancers (Patai et al., 2015; Taniguchi et al., 2005). Cependant comme mentionné dans l'introduction, WIF1 est exprimé dans des lésions de souris Apc^{min/+} et dans la muqueuse intestinale de souris traitées avec des agents chimiques carcinogènes (Cebrat et al., 2004; Koyama et al., 2015; Suzuki et al., 2007). Les différents auteurs ont suggéré que l'induction de l'expression de WIF1 était une réponse de la cellule afin de réguler et combattre les différentes anomalies se manifestant suite à l'induction tumorale. L'expression de WIF1 serait donc la marque d'une carcinogenèse précoce. Les analyses faites par l'équipe sur les différentes souris présentes dans le laboratoire ont montré non seulement que la surexpression de TR α 1 accélère la carcinogenèse, mais aussi que son inhibition la ralentit. Une augmentation de TR α 1 déséquilibrerait cette balance en faveur de l'inhibition de WIF1 et de l'activation de la voie Wnt.

Grâce à des analyses *in silico*, nous avons pu mettre en évidence la présence d'un site TRE dans le promoteur du gène *Wif1*. Nous avons confirmé cette interaction par immunoprécipitation de chromatine suggérant que TR α 1 serait capable de réprimer *Wif1* de manière directe. C'est ainsi que nous décrivons un nouveau mécanisme par lequel TR α 1 favoriserait l'activation de la voie Wnt et donc la progression tumorale.

C) Une voie Wnt fortement régulée

Nous ne pouvons pas exclure que d'autres gènes soient impliqués dans l'accélération du processus tumoral causée par la surexpression de TR α 1. Il se peut même que la suractivation de la voie Wnt nécessite d'autres gènes et notre analyse transcriptomique est un outil qui nous permet d'approfondir ces mécanismes. En effet, lorsque nous regardons plus en détail, nous trouvons d'autres gènes différentiellement exprimés appartenant à la voie Wnt. Parmi eux se trouvent *Sox17* et le complexe *Znrf3/Rnf43*. Le premier est décrit comme un antagoniste de la voie Wnt puisqu'il inhibe l'activité de la β -caténine par séquestration (Kormish et al., 2010) et il est fortement réprimé dans les tumeurs *vil-TR α 1/Apc^{1638N/+}* (Fold-change : 55,62743). De plus, il est souvent méthylé dans les cancers (Galamb et al., 2016; Li et al., 2012; Suraweera et al., 2006) et l'inhibition de son expression est associée à la prolifération (Sinner et al., 2007; Ye et al., 2011), à la progression tumorale (Fu et al., 2015), ainsi qu'à un mauvais pronostic chez des patients atteints de CRC (Lu et al., 2014). Inversement, sa réexpression permet de contrôler des processus tels que la transition épithelio-mésenchymateuse (TEM) et l'apparition de métastase. (Li et al., 2015).

D'autre part, le complexe ZNRF3/RNF43 qui est régulé négativement dans les tumeurs *vil-TR α 1/Apc^{1638N/+}* (ZNRF3 : -4,1595874; RNF43: -8,254179), permet aussi de réguler négativement la voie Wnt en favorisant la dégradation de la β -caténine par le protéasome (Yan et al., 2017). De la même manière, leur expression est souvent altérée dans les cancers colorectaux (Bond et al., 2016) et la baisse d'expression est corrélée à la progression tumorale

dans plusieurs cancers dont le CRC (Katoh and Katoh, 2017; Yu et al., 2016). Rappelons que ce complexe est inhibé par les récepteurs LGR4/5/6. Cependant, seul *Lgr5*, marqueur de cellules souches, est présent dans notre analyse transcriptomique mais est régulé négativement (Fold-change: - 11,811121) contrairement à nos attentes. Néanmoins, une étude a montré que RSPO2 interagit avec LGR5 afin de stabiliser ZNRF3, agissant ainsi en tant que boucle de rétrocontrôle négatif de la voie Wnt (Wu et al., 2014). Ceci expliquerait donc la diminution de son expression dans les tumeurs *vil-TRα1/Apc^{1638N/+}*. Ces données montrent que TRα1 pourrait favoriser l'activation de la voie Wnt en agissant négativement sur d'autres antagonistes de cette voie, tel qu'il l'a été montré pour WIF1.

D) D'autres mécanismes à analyser

La voie Wnt n'est pas la seule voie régulée dans notre analyse et il suffit de regarder les bio-fonctions et les gènes les plus fortement régulés pour l'affirmer.

CXCR5 (Fold-change : +627) est une protéine appartenant à la famille de récepteur de chimiokine et est impliquée dans la migration des lymphocyte B dans les follicules de la rate et dans les plaques de Peyer dans l'intestin. De manière intéressante, son expression est retrouvée dans 43,6% de cancer de colon, et est associée d'une part aux métastases distales et aux nœuds lymphatiques, et d'autre part au stade tumoral et à la rechute tumorale (Tan Q et al 2015).

AICDA (Fold-change : 233) est une désaminase impliquée dans l'hypermutation somatique et la commutation isotopique de gènes codant pour l'immunoglobuline. Son expression est régulée positivement dans les cancers colorectaux (Gushima et al 2011, Takai et al 2012).

ANXA10 (Fold-change : -2380) est un membre de la famille des annexines appartenant aux protéines liant les phospholipides dépendants du calcium et joue un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire et de la transduction de signal des voies de signalisation. Il a été décrit comme étant suppresseur de tumeur puisque son inhibition est corrélée à la dédifférenciation, l'invasion et la progression tumorale (Kim et al 2015).

EXPI (Fold-change : -1749) aussi connu sous le nom de *Wfdc18* ou *Wdnm1*, est un inhibiteur de protéinase extracellulaire dont la surexpression est associée à l'apoptose (Jung et al., 2004) et son homologue chez le rat a été décrit comme un suppresseur de tumeurs potentiel (Dear et al., 1988). De manière intéressante, une étude a montré que son expression augmente dans des adénomes intestinaux de souris *Apc^{Min/+}* (Reichling et al., 2005) suggérant un rôle important de prévention contre l'invasion cellulaire dans le cas d'une carcinogenèse précoce comme il l'a été observé pour *WIF1*. Cette liste pourrait s'élargir mais il est important de noter que chacun des gènes décrits dans ce paragraphe ou dans le précédent est impliqué dans la carcinogenèse de manière individuelle. De manière intéressante, nous retrouvons l'ensemble de ces gènes régulés dans notre analyse transcriptomique. Suite à la surexpression de *TRα1* dans l'épithélium intestinal de multiples mécanismes pourraient donc survenir de manière simultanée ou séquentielle afin de favoriser la progression tumorale. Notre analyse transcriptomique ouvre ainsi la porte à de nouvelles informations qui permettront à l'équipe d'étudier en détail les évènements moléculaires de la carcinogenèse dépendante de *TRα1*.

II. TRα1 et implication dans le cancer colorectal

A) Confirmation des données murines chez l'homme

Comme mentionné dans l'introduction, plusieurs études ont tenté de définir une fonction précise des hormones thyroïdiennes vis à vis de la progression tumorale. Cependant aujourd'hui cela n'est pas clairement établi puisque pendant que des études associent aux HTs un rôle anti-tumoral, d'autres les caractérisent comme pro-tumoral (Brown et al., 2013). Néanmoins, il est clair aujourd'hui que le récepteur *TRα1* est capable de favoriser la progression tumorale. En effet, l'équipe a pu montrer chez la souris que la coopération entre *TRα1* et la voie *Wnt* permet d'accélérer le phénotype tumoral. Pendant ma thèse, nous avons également pu démontrer chez l'homme une corrélation existante entre *TRα1* et la voie *Wnt* dans les cancers colorectaux, ainsi que la régulation du gène *WIF1* par *TRα1* grâce à la présence d'un site TRE putatif comme

montré chez la souris. De la même manière, nous avons pu montrer que l'inhibition de TR α 1 et donc de la voie Wnt, permet de freiner le phénotype tumoral de lignées de cancer colorectal. A l'inverse, la surexpression de TR α 1 favorise l'activation de la voie Wnt et la prolifération cellulaire. En outre, lorsque nous avons analysé des cohortes de tumeurs, nous avons mis en évidence une forte répression de WIF1 dans les tumeurs présentant une augmentation de l'expression de TR α 1. Ces résultats reflètent les données observées chez la souris et accentuent un rôle majeur de TR α 1 dans la progression tumorale. Cependant, à cause de la méthylation du gène *WIF1* dans les cellules Caco2, comme dans la plupart des lignées de CRC (Taniguchi et al., 2005), nous n'avons pas pu confirmé la régulation de WIF1 par TR α 1 *in vitro*. De plus, nos approche avec l'ajout de la protéine recombinante WIF1 dans le milieu, n'ont pas permis de mettre en évidence son activité sur la prolifération des cellules ou sur la voie Wnt. Finalement, cela n'est pas surprenant, car les cellules Caco2 présentent une mutation du gène *APC* qui rend la voie Wnt indépendantes de facteurs externes. Dans ce contexte, notre hypothèse est que TR α 1 régulerait positivement la voie Wnt en impliquant d'autres mécanismes comme nous l'évoquons dans le paragraphe précédent.

Nous avons également utilisé le modèle *ex-vivo* d'organoïdes générés partir de souris KO conditionnel pour le gène *Apc* (villin-creERT2/*Apc* Δ 14^{fl/+}). Cependant la délétion de l'allèle *Apc* à elle seule, n'avait pas de conséquences sur l'expression de *Wif1*. Bien que cet évènement soit indispensable à l'initiation tumorale, nous présumons que la transformation tumorale n'était pas encore engagée et nous aurions dû très probablement mener l'expérience sur des temps plus longs.

B) TR α 1, un marqueur d'une hétérogénéité tumorale

Nous avons montré dans les tumeurs de souris *Apc*^{1638N/+}, une augmentation significative de l'expression de TR α 1 par rapport au tissu sain correspondant et de même lorsque nous les comparons aux tissus issus de souris WT. Etonnement au sein du même groupe de tumeurs,

TR α 1 est exprimé de manière très hétérogène. L'analyse faite sur les groupes tumoraux définis dans Marisa et al., 2013, nous a permis de retrouver cette hétérogénéité chez l'homme dans les 6 sous-groupes de CRC caractérisés par cette étude. Ces données illustrent parfaitement l'hétérogénéité entre des tumeurs possédant des caractéristiques communes, comme déjà évoqué par la communauté scientifique (Marusyk and Polyak, 2010; Shackleton et al., 2009). D'autre part nous avons constaté qu'au sein même des tumeurs issues de souris Apc^{1638N/+}, des zones présentaient des marquages TR α 1 plus importants que d'autres. Les marquages par immunohistochimie chez les tumeurs de patients ont confirmé ces analyses et montrent une importante hétérogénéité intra-tumorale déjà décrite par plusieurs équipes (Gerlinger et al., 2012; Martinez et al., 2017; Marusyk and Polyak, 2010). Il est important de mentionner que l'hétérogénéité intra-tumorale est décrite comme la coexistence de populations de cellules cancéreuses avec des parcours évolutifs différents au sein d'une même tumeur. Cette hétérogénéité donnerait un avantage à la tumeur puisqu'elle permettrait de créer un réservoir de cellules chimiorésistance (Gerlinger et al., 2012) et par ailleurs, elle est décrite comme un marqueur d'un pronostic défavorable comme c'est dans le cas du cancer du sein (Park et al., 2010). Nos données sur nos cohortes concernant l'expression de TR α 1 montrent une forte hétérogénéité au sein des tumeurs suggérant que TR α 1 pourrait conférer un avantage à la tumeur. Ces hypothèses sont à confirmer et cela permettrait d'ouvrir des nouveaux champs d'études concernant un possible rôle de TR α 1 dans la chimiorésistance.

L'ensemble de ces travaux accentue donc d'une part, l'importance des études concernant le rôle de TR α 1 dans la progression tumorale chez l'homme, et d'autre part l'intérêt de TR α 1 comme une cible thérapeutique dans le traitement contre le cancer colorectal.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, S., Namba, N., Abe, M., Fujiwara, M., Aikawa, T., Kogo, M., and Ozono, K. (2012). Monocarboxylate transporter 10 functions as a thyroid hormone transporter in chondrocytes. *Endocrinology* 153, 4049–4058.
- Adamo, B., and Anders, C.K. (2011). Stratifying triple-negative breast cancer: which definition(s) to use? *Breast Cancer Res. BCR* 13, 105.
- Ahn, S.-J., Choi, C., Choi, Y.-D., Kim, Y.-C., Kim, K.-S., Oh, I.-J., Ban, H.-J., Yoon, M.-S., Nam, T.-K., Jeong, J.-U., et al. (2014). Microarray analysis of gene expression in lung cancer cell lines treated by fractionated irradiation. *Anticancer Res.* 34, 4939–4948.
- Albuquerque, C., Breukel, C., van der Luijt, R., Fidalgo, P., Lage, P., Slors, F.J.M., Leitão, C.N., Fodde, R., and Smits, R. (2002). The “just-right” signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1549–1560.
- van Amerongen, R., and Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3205–3214.
- Barker, N., and Clevers, H. (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138, 1681–1696.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611.
- Barker, N., Bartfeld, S., and Clevers, H. (2010). Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell* 7, 656–670.
- Basso, G., Bianchi, P., Malesci, A., and Laghi, L. (2017). Hereditary or sporadic polyposis syndromes. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 31, 409–417.
- 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.W., 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.
- Bergh, J.J., Lin, H.-Y., Lansing, L., Mohamed, S.N., Davis, F.B., Mousa, S., and Davis, P.J. (2005). Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146, 2864–2871.
- Bertrand, F.E., Angus, C.W., Partis, W.J., and Sigounas, G. (2012). Developmental

pathways in colon cancer: Crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle* 11, 4344.

Beumer, J., and Clevers, H. (2016). Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Dev. Camb. Engl.* 143, 3639–3649.

Bezençon, C., le Coutre, J., and Damak, S. (2007). Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem. Senses* 32, 41–49.

Bianco, A.C., and Kim, B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 116, 2571–2579.

Bijlsma, M.F., Sadanandam, A., Tan, P., and Vermeulen, L. (2017). Molecular subtypes in cancers of the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 333–342.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (2010). Cell Lineage metastability in Gfi1-deficient mouse intestinal epithelium. *Dev. Biol.* 345, 49–63.

Bochukova, E., Schoenmakers, N., Agostini, M., Schoenmakers, E., Rajanayagam, O., Keogh, J.M., Henning, E., Reinemund, J., Gevers, E., Sarri, M., et al. (2012). A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *N. Engl. J. Med.* 366, 243–249.

Boivin, G.P., Washington, K., Yang, K., Ward, J.M., Pretlow, T.P., Russell, R., Besselsen, D.G., Godfrey, V.L., Doetschman, T., Dove, W.F., et al. (2003). Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124, 762–777.

Bond, C.E., McKeone, D.M., Kalimutho, M., Bettington, M.L., Pearson, S.-A., Dumenil, T.D., Wockner, L.F., Burge, M., Leggett, B.A., and Whitehall, V.L.J. (2016). RNF43 and ZNRF3 are commonly altered in serrated pathway colorectal tumorigenesis. *Oncotarget*.

Boursi, B., Haynes, K., Mamtani, R., and Yang, Y.-X. (2015). Thyroid dysfunction, thyroid hormone replacement and colorectal cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 107.

Bray, S.J. (2016). Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 722–735.

Brown, A.R., Simmen, R.C.M., and Simmen, F.A. (2013). The Role of Thyroid Hormone Signaling in the Prevention of Digestive System Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16240–16257.

Cao, X., Kambe, F., Moeller, L.C., Refetoff, S., and Seo, H. (2005). Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 102–112.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.

Caro, I., Boulenc, X., Rousset, M., Meunier, V., Bourrié, M., Julian, B., Joyeux, H., Roques, C., Berger, Y., Zweibaum, A., et al. (1995). Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *Int. J. Pharm.* 116, 147–158.

- Carriere, R.M. (1966). The influence of thyroid and testicular hormones on the epithelium of crypts of Lieberkühn in the rat's intestine. *Anat. Rec.* *156*, 423–431.
- Cebrat, M., Strzadala, L., and Kisielow, P. (2004). Wnt inhibitory factor-1: a candidate for a new player in tumorigenesis of intestinal epithelial cells. *Cancer Lett.* *206*, 107–113.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011). Vital signs: Colorectal cancer screening, incidence, and mortality--United States, 2002-2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* *60*, 884–889.
- Chang, L.-C., Chen, T.-C., Chen, S.-J., Chen, C.-L., Lee, C.-C., Wu, S.-H., Yen, Y., Huang, H.-S., and Lin, J.-J. (2015). Identification of a new class of WNT1 inhibitor: Cancer cells migration, G-quadruplex stabilization and target validation. *Oncotarget*.
- Charles, N., Ozawa, T., Squatrito, M., Bleau, A.-M., Brennan, C.W., Hambardzumyan, D., and Holland, E.C. (2010). Perivascular Nitric Oxide Activates Notch Signaling and Promotes Stem-like Character in PDGF-induced Glioma Cells. *Cell Stem Cell* *6*.
- Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., and Samarut, J. (1997). Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *11*, 1278–1290.
- Ciavardelli, D., Bellomo, M., Crescimanno, C., and Vella, V. (2014). Type 3 deiodinase: role in cancer growth, stemness, and metabolism. *Front. Endocrinol.* *5*, 215.
- Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* *154*, 274–284.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* *149*, 1192–1205.
- Clevers, H.C., and Bevins, C.L. (2013). Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu. Rev. Physiol.* *75*, 289–311.
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *84*, 1619–1630.
- Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a015081.
- Davis, F.B., Mousa, S.A., O'Connor, L., Mohamed, S., Lin, H.-Y., Cao, H.J., and Davis, P.J. (2004). Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circ. Res.* *94*, 1500–1506.
- Davis, H., Irshad, S., Bansal, M., Rafferty, H., Boitsova, T., Bardella, C., Jaeger, E., Lewis, A., Freeman-Mills, L., Giner, F.C., et al. (2015). Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nat. Med.* *21*, 62–70.

- Davis, P.J., Davis, F.B., and Lawrence, W.D. (1989). Thyroid hormone regulation of membrane Ca²⁺-ATPase activity. *Endocr. Res.* *15*, 651–682.
- Davis, P.J., Goglia, F., and Leonard, J.L. (2016). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat. Rev. Endocrinol.* *12*, 111–121.
- De Sousa E Melo, F., Wang, X., Jansen, M., Fessler, E., Trinh, A., de Rooij, L.P.M.H., de Jong, J.H., de Boer, O.J., van Leersum, R., Bijlsma, M.F., et al. (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* *19*, 614–618.
- Dear, T.N., Ramshaw, I.A., and Kefford, R.F. (1988). Differential expression of a novel gene, WDNM1, in nonmetastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* *48*, 5203–5209.
- Demir, K., van Gucht, A.L.M., Büyükinan, M., Çatlı, G., Ayhan, Y., Nijat Bas, V., DüNDAR, B., Özkan, B., Meima, M.E., Edward Visser, W., et al. (2016). Diverse Genotypes and Phenotypes of Three Novel Thyroid Hormone Receptor Alpha Mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc20161404.
- Demitrack, E.S., and Samuelson, L.C. (2016). Notch regulation of gastrointestinal stem cells. *J. Physiol.* *594*, 4791–4803.
- Denison, T.A., and Bae, Y.H. (2012). Tumor heterogeneity and its implication for drug delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *164*, 187–191.
- Drost, J., van Jaarsveld, R.H., Ponsioen, B., Zimmerlin, C., van Boxtel, R., Buijs, A., Sachs, N., Overmeer, R.M., Offerhaus, G.J., Begthel, H., et al. (2015). Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* *521*, 43–47.
- Dumitrescu, A.M., Liao, X.-H., Best, T.B., Brockmann, K., and Refetoff, S. (2004). A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am. J. Hum. Genet.* *74*, 168–175.
- 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.
- Eckey, M., Moehren, U., and Baniahmad, A. (2003). Gene silencing by the thyroid hormone receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* *213*, 13–22.
- Emons, G., Spitzner, M., Reineke, S., Möller, J., Auslander, N., Kramer, F., Hu, Y., Beissbarth, T., Wolff, H.A., Rave-Fränk, M., et al. (2017). Chemoradiotherapy Resistance in Colorectal Cancer Cells is Mediated by Wnt/ β -catenin Signaling. *Mol. Cancer Res. MCR.*
- 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. (2012). A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1918–1927.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *6*, 479–507.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.

Feng, Y., Sentani, K., Wiese, A., Sands, E., Green, M., Bommer, G.T., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (2013). Sox9 Induction, Ectopic Paneth Cells, and Mitotic Spindle Axis Defects in Mouse Colon Adenomatous Epithelium Arising From Conditional Biallelic Apc Inactivation. *Am. J. Pathol.* 183, 493–503.

Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559.

Flentjar, N., Chu, P.-Y., Ng, A.Y.-N., Johnstone, C.N., Heath, J.K., Ernst, M., Hertzog, P.J., and Pritchard, M.A. (2007). TGF-betaRII rescues development of small intestinal epithelial cells in Elf3-deficient mice. *Gastroenterology* 132, 1410–1419.

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.

Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., and Khan, P.M. (1994). A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8969–8973.

Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Kedinger, M., Malaval, L., et al. (1997). The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J.* 16, 4412–4420.

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.

Friesema, E.C.H., Grueters, A., Biebermann, H., Krude, H., von Moers, A., Reeser, M., Barrett, T.G., Mancilla, E.E., Svensson, J., Kester, M.H.A., et al. (2004). Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet Lond. Engl.* 364, 1435–1437.

Friesema, E.C.H., Jansen, J., Jachtenberg, J.-W., Visser, W.E., Kester, M.H.A., and Visser, T.J. (2008). Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 1357–1369.

Fu, D.-Y., Tan, H.-S., Wei, J.-L., Zhu, C.-R., Jiang, J.-X., Zhu, Y.-X., Cai, F.-L., Chong, M.-H., and Ren, C.-L. (2015). Decreased expression of SOX17 is associated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 8025–8034.

Furlow, J.D., and Neff, E.S. (2006). A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 17, 40–47.

Gagliardi, G., Moroz, K., and Bellows, C.F. (2012). Immunolocalization of DCAMKL-1, a

putative intestinal stem cell marker, in normal colonic tissue. *Pathol. Res. Pract.* *208*, 475–479.

Galamb, O., Kalmár, A., Péterfia, B., Csabai, I., Bodor, A., Ribli, D., Krenács, T., Patai, Á.V., Wichmann, B., Barták, B.K., et al. (2016). Aberrant DNA methylation of WNT pathway genes in the development and progression of CIMP-negative colorectal cancer. *Epigenetics* *11*, 588–602.

Galton, V.A., Schneider, M.J., Clark, A.S., and St Germain, D.L. (2009). Life without thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion: studies in mice devoid of the 5'-deiodinases. *Endocrinology* *150*, 2957–2963.

Gauthier, K., Plateroti, M., Harvey, C.B., Williams, G.R., Weiss, R.E., Refetoff, S., Willott, J.F., Sundin, V., Roux, J.P., Malaval, L., et al. (2001). Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4748–4760.

Gayet, J., Zhou, X.P., Duval, A., Rolland, S., Hoang, J.M., Cottu, P., and Hamelin, R. (2001). Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* *20*, 5025–5032.

Gebert, A., al-Samir, K., Werner, K., Fassbender, S., and Gebhard, A. (2000). The apical membrane of intestinal brush cells possesses a specialised, but species-specific, composition of glycoconjugates--on-section and in vivo lectin labelling in rats, guinea-pigs and mice. *Histochem. Cell Biol.* *113*, 389–399.

Gebhard, A., and Gebert, A. (1999). Brush cells of the mouse intestine possess a specialized glycocalyx as revealed by quantitative lectin histochemistry. Further evidence for a sensory function. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *47*, 799–808.

Gerashchenko, T.S., Denisov, E.V., Litviakov, N.V., Zavyalova, M.V., Vtorushin, S.V., Tsyganov, M.M., Perelmuter, V.M., and Cherdyntseva, N.V. (2013). Intratumor heterogeneity: nature and biological significance. *Biochem. Biokhimiia* *78*, 1201–1215.

Gerbe, F., Brulin, B., Makrini, L., Legraverend, C., and Jay, P. (2009). DCAMKL-1 expression identifies Tuft cells rather than stem cells in the adult mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology* *137*, 2179-2180; author reply 2180-2181.

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.

Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 2907–2917.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* *366*, 883–892.

- Gill, R.K., Saksena, S., Alrefai, W.A., Sarwar, Z., Goldstein, J.L., Carroll, R.E., Ramaswamy, K., and Dudeja, P.K. (2005). Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *289*, C846-852.
- González-Sancho, J.M., García, V., Bonilla, F., and Muñoz, A. (2003). Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett.* *192*, 121–132.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* *458*, 1127–1130.
- 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.e1-3.
- Griffith, A.J., Szymko, Y.M., Kaneshige, M., Quiñónez, R.E., Kaneshige, K., Heintz, K.A., Mastroianni, M.A., Kelley, M.W., and Cheng, S. (2002). Knock-in mouse model for resistance to thyroid hormone (RTH): an RTH mutation in the thyroid hormone receptor beta gene disrupts cochlear morphogenesis. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* *3*, 279–288.
- van Gucht, A.L.M., Meima, M.E., Zwaveling-Soonawala, N., Visser, W.E., Fliers, E., Wennink, J.M.B., Henny, C., Visser, T.J., Peeters, R.P., and van Trotsenburg, A.S.P. (2016). Resistance to Thyroid Hormone Alpha in an 18-Month-Old Girl: Clinical, Therapeutic, and Molecular Characteristics. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* *26*, 338–346.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., Reyniès, A. de, Schlicker, A., Sonesson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat. Med.* *21*, 1350.
- Hadj-Sahraoui, N., Seugnet, I., Ghorbel, M.T., and Demeneix, B. (2000). Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neurosci. Lett.* *280*, 79–82.
- Hallikas, O., Palin, K., Sinjushina, N., Rautiainen, R., Partanen, J., Ukkonen, E., and Taipale, J. (2006). Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell* *124*, 47–59.
- 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.G., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G.J.A., and Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* *303*, 1684–1686.
- Hashimoto, K., Curty, F.H., Borges, P.P., Lee, C.E., Abel, E.D., Elmquist, J.K., Cohen, R.N., and Wondisford, F.E. (2001). An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 3998–4003.
- Hassan, M.M., Kaseb, A., Li, D., Patt, Y.Z., Vauthey, J.-N., Thomas, M.B., Curley, S.A., Spitz, M.R., Sherman, S.I., Abdalla, E.K., et al. (2009). Association between hypothyroidism and hepatocellular carcinoma: a case-control study in the United States. *Hepatol. Baltim. Md*

49, 1563–1570.

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.

Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 466–479.

Henning, S D. Rubin, and S. Shulman (1994). Ontogeny of the intestinal mucosa.

Herbst, R.S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 21–26.

Hernandez, A., Martinez, M.E., Fiering, S., Galton, V.A., and Germain, D.S. (2006). Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J. Clin. Invest.* 116, 476.

Hernandez, A., Martinez, M.E., Liao, X.-H., Van Sande, J., Refetoff, S., Galton, V.A., and St Germain, D.L. (2007). Type 3 deiodinase deficiency results in functional abnormalities at multiple levels of the thyroid axis. *Endocrinology* 148, 5680–5687.

Heublein, S., Mayr, D., Meindl, A., Angele, M., Gallwas, J., Jeschke, U., and Ditsch, N. (2015). Thyroid Hormone Receptors Predict Prognosis in BRCA1 Associated Breast Cancer in Opposing Ways. *PloS One* 10, e0127072.

Höfer, D., and Drenckhahn, D. (1992). Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry* 98, 237–242.

Höfer, D., and Drenckhahn, D. (1996). Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochem. Cell Biol.* 105, 405–412.

Höfer, D., Püschel, B., and Drenckhahn, D. (1996). Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6631–6634.

Hoover, B., Baena, V., Kaelberer, M.M., Getaneh, F., Chinchilla, S., and Bohórquez, D.V. (2017). The intestinal tuft cell nanostructure in 3D. *Sci. Rep.* 7, 1652.

Hörkkö, T.T., Tuppurainen, K., George, S.M., Jernvall, P., Karttunen, T.J., and Mäkinen, M.J. (2006). Thyroid hormone receptor beta1 in normal colon and colorectal cancer-association with differentiation, polypoid growth type and K-ras mutations. *Int. J. Cancer* 118, 1653–1659.

Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431–436.

hüelsken, J., Hiilsken, J6rg, Pike, U.S.N.L. of M. 8600 R., MD, B., and Usa, 20894 (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 127, 2061.

- Iishi, H., Tatsuta, M., Baba, M., Okuda, S., and Taniguchi, H. (1992). Enhancement by thyroxine of experimental carcinogenesis induced in rat colon by azoxymethane. *Int. J. Cancer* *50*, 974–976.
- Irizarry, R.A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., et al. (2009). Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* *41*, 178–186.
- Ishizuya-Oka, A., and Hasebe, T. (2008). Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein-4 signaling pathway involved in epithelial cell renewal along the radial axis of the intestine. *Digestion* *77 Suppl 1*, 42–47.
- Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (2005). Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration. *Dev. Growth Differ.* *47*, 601–607.
- Issa, I.A., and Nouredine, M. (2017). Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World J. Gastroenterol.* *23*, 5086–5096.
- Ito, M., Toyoda, N., Nomura, E., Takamura, Y., Amino, N., Iwasaka, T., Takamatsu, J., Miyauchi, A., and Nishikawa, M. (2011). Type 1 and type 2 iodothyronine deiodinases in the thyroid gland of patients with 3,5,3'-triiodothyronine-predominant Graves' disease. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* *164*, 95–100.
- 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.
- Jass, J.R. (2007). Gastrointestinal polyposis: clinical, pathological and molecular features. *Gastroenterol. Clin. North Am.* *36*, 927–946, viii.
- 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.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat. Genet.* *24*, 36–44.
- Jung, D.J., Bong, J.J., and Baik, M. (2004). Extracellular proteinase inhibitor-accelerated apoptosis is associated with B cell activating factor in mammary epithelial cells. *Exp. Cell Res.* *292*, 115–122.
- Kalyanaraman, H., Schwappacher, R., Joshua, J., Zhuang, S., Scott, B.T., Klos, M., Casteel, D.E., Frangos, J.A., Dillmann, W., Boss, G.R., et al. (2014). Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Sci. Signal.* *7*, ra48.
- Kamiya, Y., Puzianowska-Kuznicka, M., McPhie, P., Nauman, J., Cheng, S., and Nauman, A. (2002). Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with human renal clear cell carcinoma. *Carcinogenesis* *23*, 25–33.
- Kamiya, Y., Zhang, X.-Y., Ying, H., Kato, Y., Willingham, M.C., Xu, J., O'Malley, B.W., and

- Cheng, S.-Y. (2003). Modulation by steroid receptor coactivator-1 of target-tissue responsiveness in resistance to thyroid hormone. *Endocrinology* *144*, 4144–4153.
- Kaneshige, M., Kaneshige, K., Zhu, X., Dace, A., Garrett, L., Carter, T.A., Kazlauskaitė, R., Pankratz, D.G., Wynshaw-Boris, A., Refetoff, S., et al. (2000). Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13209–13214.
- Kaneshige, M., Suzuki, H., Kaneshige, K., Cheng, J., Wimbrow, H., Barlow, C., Willingham, M.C., and Cheng, S. (2001). A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone alpha 1 receptor causes increased mortality, infertility, and dwarfism in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 15095–15100.
- Katoh, M., and Katoh, M. (2017). Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.*
- 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. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 2619–2628.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* *116*, 2627–2634.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stannek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev. Cell* *7*, 525–534.
- Kerekes, K., Bányai, L., and Patthy, L. (2015). Wnts grasp the WIF domain of Wnt Inhibitory Factor 1 at two distinct binding sites. *FEBS Lett.* *589*, 3044–3051.
- Kim, W.G., and Cheng, S. (2013). Thyroid hormone receptors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1830*, 3928–3936.
- Kim, D.K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S.H., and Endou, H. (2001). Expression Cloning of a Na⁺-independent Aromatic Amino Acid Transporter with Structural Similarity to H⁺/Monocarboxylate Transporters. *J. Biol. Chem.* *276*, 17221–17228.
- Kim, J.-G., Kim, M.-J., Choi, W.-J., Moon, M.-Y., Kim, H.-J., Lee, J.-Y., Kim, J., Kim, S.-C., Kang, S.G., Seo, G.-Y., et al. (2016). Wnt3A Induces GSK-3 β Phosphorylation and β -Catenin Accumulation Through RhoA/ROCK. *J. Cell. Physiol.*
- Kim, T.-H., Escudero, S., and Shivdasani, R.A. (2012). 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.
- Kinne, A., Schüle, R., and Krause, G. (2011). Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res.* *4 Suppl 1*, S7.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159–170.

Knudson, A.G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10914–10921.

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.R., Maurice, M.M., et al. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature* *488*, 665–669.

Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* *137*, 216–233.

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.

Kormish, J.D., Sinner, D., and Zorn, A.M. (2010). Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *239*, 56–68.

Kowalik, M.A., Perra, A., Pibiri, M., Cocco, M.T., Samarut, J., Plateroti, M., Ledda-Columbano, G.M., and Columbano, A. (2010). TRbeta is the critical thyroid hormone receptor isoform in T3-induced proliferation of hepatocytes and pancreatic acinar cells. *J. Hepatol.* *53*, 686–692.

Koyama, N., Hakura, A., Toritsuka, N., Sonoda, J., Seki, Y., Tohyama, O., Asakura, S., Nakano-Ito, K., and Hosokawa, S. (2015). Wif1 and Ifitm3 gene expression preferentially altered in the colon mucosa of benzo[a]pyrene pre-treated mice following exposure to dextran sulfate sodium. *Chem. Biol. Interact.* *240*, 164–170.

Kress, E., Rezza, A., Nadjar, J., Samarut, J., and Plateroti, M. (2009). The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor alpha1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *J. Biol. Chem.* *284*, 1234–1241.

Kress, E., Skah, S., Sirakov, M., Nadjar, J., Gadot, N., Scoazec, J.-Y., Samarut, J., and Plateroti, M. (2010). Cooperation between the thyroid hormone receptor TRalpha1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* *138*, 1863–1874.

Kretschmar, K., and Clevers, H. (2017). Wnt/ β -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Dev. Biol.*

Ku, J.-L., Shin, Y.-K., Kim, D.-W., Kim, K.-H., Choi, J.-S., Hong, S.-H., Jeon, Y.-K., Kim, S.-H., Kim, H.-S., Park, J.-H., et al. (2010). Establishment and characterization of 13 human colorectal carcinoma cell lines: mutations of genes and expressions of drug-sensitivity genes and cancer stem cell markers. *Carcinogenesis* *31*, 1003–1009.

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.

Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification

from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* *19*, 207–226.

Lazar, M.A. (1993). Thyroid Hormone Receptors: Multiple Forms, Multiple Possibilities. *Endocr. Rev.* *14*, 184–193.

Leary, R.J., Lin, J.C., Cummins, J., Boca, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Sjöblom, T., Park, B.-H., Parsons, R., et al. (2008). Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16224–16229.

Lehrer, S., Diamond, E.J., Bajwa, A.M., Kornreich, R., Stagger, S., Stone, N.N., Droller, M.J., and Stock, R.G. (2001). Association between serum triiodothyronine (t3) level and risk of disease recurrence in men with localized prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* *4*, 232–234.

Leppänen, J., Helminen, O., Huhta, H., Kauppila, J.H., Miinalainen, I., Ronkainen, V.-P., Saarnio, J., Lehenkari, P.P., and Karttunen, T.J. (2016). Doublecortin-like kinase 1-positive enterocyte - a new cell type in human intestine. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *124*, 958–965.

Lewis, J.R. (2017). Colon Cancer Staging: TNM Classification for Colon Cancer.

Li, J.-Y., Han, C., Zheng, L.-L., and Guo, M.-Z. (2012). Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway gene SRY-related HMG-box 17 in papillary thyroid carcinoma. *Chin. Med. J. (Engl.)* *125*, 3526–3531.

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 Rep.* *3*, 876–891.

Li, Y., Lv, Z., He, G., Wang, J., Zhang, X., Lu, G., Ren, X., Wang, F., Zhu, X., Ding, Y., et al. (2015). The SOX17/miR-371-5p/SOX2 axis inhibits EMT, stem cell properties and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget* *6*, 9099–9112.

Lin, H.-Y., Sun, M., Tang, H.-Y., Lin, C., Luidens, M.K., Mousa, S.A., Incerpi, S., Drusano, G.L., Davis, F.B., and Davis, P.J. (2009). L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C980-991.

Lin, K.H., Lin, Y.W., Lee, H.F., Liu, W.L., Chen, S.T., Chang, K.S., and Cheng, S.Y. (1995). Increased invasive activity of human hepatocellular carcinoma cells is associated with an overexpression of thyroid hormone beta 1 nuclear receptor and low expression of the anti-metastatic nm23 gene. *Cancer Lett.* *98*, 89–95.

Lin, K.H., Shieh, H.Y., Chen, S.L., and Hsu, H.C. (1999). Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Carcinog.* *26*, 53–61.

Liu, Y.-Y., Schultz, J.J., and Brent, G.A. (2003). A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J. Biol. Chem.* *278*, 38913–38920.

- Lu, J., Zhang, G., Cheng, Y., Tang, Y., Dong, Z., McElwee, K.J., and Li, G. (2014). Reduced expression of SRY-box containing gene 17 correlates with an unfavorable melanoma patient survival. *Oncol. Rep.* *32*, 2571–2579.
- Madison, B.B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X.T., and Gumucio, D.L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 279–289.
- Magée, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* *21*, 283.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 459–465.
- Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.-C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., et al. (2013). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* *10*, e1001453.
- Markowitz, S., Haut, M., Stellato, T., Gerbic, C., and Molkenin, K. (1989). Expression of the ErbA-beta class of thyroid hormone receptors is selectively lost in human colon carcinoma. *J. Clin. Invest.* *84*, 1683–1687.
- Martinez, P., Kimberley, C., BirkBak, N.J., Marquard, A., Szallasi, Z., and Graham, T.A. (2017). Quantification of within-sample genetic heterogeneity from SNP-array data. *Sci. Rep.* *7*, 3248.
- Marusyk, A., and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta* *1805*, 105–117.
- Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., and Sato, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat. Med.* *21*, 256–262.
- May, R., Riehl, T.E., Hunt, C., Sureban, S.M., Anant, S., and Houchen, C.W. (2008). Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 630–637.
- May, R., Sureban, S.M., Hoang, N., Riehl, T.E., Lightfoot, S.A., Ramanujam, R., Wyche, J.H., Anant, S., and Houchen, C.W. (2009). Doublecortin and CaM kinase-like-1 and leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor mark quiescent and cycling intestinal stem cells, respectively. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 2571–2579.
- McCart, A.E., Vickaryous, N.K., and Silver, A. (2008). Apc mice: models, modifiers and mutants. *Pathol. Res. Pract.* *204*, 479–490.
- McGill, M.A., Dho, S.E., Weinmaster, G., and McGlade, C.J. (2009). Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J. Biol. Chem.* *284*, 26427–26438.
- McKinley, E.T., Sui, Y., Al-Kofahi, Y., Millis, B.A., Tyska, M.J., Roland, J.T., Santamaria-Pang,

- A., Ohland, C.L., Jobin, C., Franklin, J.L., et al. (2017). Optimized multiplex immunofluorescence single-cell analysis reveals tuft cell heterogeneity. *JCI Insight* 2.
- Medema, J.P., and Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474, 318–326.
- Mellitzer, G., Beucher, A., Lobstein, V., Michel, P., Robine, S., Kedinger, M., and Gradwohl, G. (2010). Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J. Clin. Invest.* 120, 1708–1721.
- Michor, F., and Polyak, K. (2010). The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 3, 1361–1364.
- Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., and Ciaccio, P.J. (2004). Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 82, 341–358.
- Mishkin, S.Y., Pollack, R., Yalovsky, M.A., Morris, H.P., and Mishkin, S. (1981). Inhibition of local and metastatic hepatoma growth and prolongation of survival after induction of hypothyroidism. *Cancer Res.* 41, 3040–3045.
- Mitsushashi, T., Tennyson, G.E., and Nikodem, V.M. (1988). Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5804–5808.
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., and Nakamura, Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.* 1, 229–233.
- Mondul, A.M., Weinstein, S.J., Bosworth, T., Remaley, A.T., Virtamo, J., and Albanes, D. (2012). Circulating thyroxine, thyroid-stimulating hormone, and hypothyroid status and the risk of prostate cancer. *PloS One* 7, e47730.
- Montgomery, R.K., Carlone, D.L., Richmond, C.A., Farilla, L., Kranendonk, M.E.G., Henderson, D.E., Baffour-Awuah, N.Y., Ambruzs, D.M., Fogli, L.K., Algra, S., et al. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 179–184.
- Moran, C., and Chatterjee, K. (2015). Resistance to thyroid hormone due to defective thyroid receptor alpha. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 647–657.
- Moran, C., Schoenmakers, N., Agostini, M., Schoenmakers, E., Offiah, A., Kydd, A., Kahaly, G., Mohr-Kahaly, S., Rajanayagam, O., Lyons, G., et al. (2013). An adult female with resistance to thyroid hormone mediated by defective thyroid hormone receptor α . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 4254–4261.
- Moran, C., Agostini, M., Visser, W.E., Schoenmakers, E., Schoenmakers, N., Offiah, A.C., Poole, K., Rajanayagam, O., Lyons, G., Halsall, D., et al. (2014). Resistance to thyroid hormone caused by a mutation in thyroid hormone receptor (TR) α 1 and TR α 2: clinical,

biochemical, and genetic analyses of three related patients. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 619–626.

Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J.H., Hamilton, S.R., Adams, H.P., Zhang, J., Clevers, H., and de Crombrughe, B. (2007). SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 133, 539–546.

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247, 322–324.

van Mullem, A., van Heerebeek, R., Chrysis, D., Visser, E., Medici, M., Andrikoula, M., Tsatsoulis, A., Peeters, R., and Visser, T.J. (2012). Clinical phenotype and mutant TR α 1. *N. Engl. J. Med.* 366, 1451–1453.

van Mullem, A.A., Chrysis, D., Eythimiadou, A., Chroni, E., Tsatsoulis, A., de Rijke, Y.B., Visser, W.E., Visser, T.J., and Peeters, R.P. (2013). Clinical phenotype of a new type of thyroid hormone resistance caused by a mutation of the TR α 1 receptor: consequences of LT4 treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 3029–3038.

Mulloy, B., and Rider, C.C. (2015). The Bone Morphogenetic Proteins and Their Antagonists. *Vitam. Horm.* 99, 63–90.

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

Nandan, M.O., and Yang, V.W. (2010). Genetic and Chemical Models of Colorectal Cancer in Mice. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 6, 51–59.

Ng, A.Y.-N., Waring, P., Ristevski, S., Wang, C., Wilson, T., Pritchard, M., Hertzog, P., and Kola, I. (2002). Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology* 122, 1455–1466.

Niehhs, C., and Acebron, S.P. (2012). Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J.* 31, 2705–2713.

Nishioka, M., Ueno, K., Hazama, S., Okada, T., Sakai, K., Suehiro, Y., Okayama, N., Hirata, H., Oka, M., Imai, K., et al. (2013). Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. *Mol. Carcinog.* 52, 207–217.

Noah, T.K., Kazanjian, A., Whitsett, J., and Shroyer, N.F. (2010). SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Exp. Cell Res.* 316, 452–465.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.

Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985–999.

Oberste-Berghaus, C., Zanger, K., Hashimoto, K., Cohen, R.N., Hollenberg, A.N., and

- Wondisford, F.E. (2000). Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators. *J. Biol. Chem.* *275*, 1787–1792.
- Øines, M., Helsing, L.M., Bretthauer, M., and Emilsson, L. (2017). Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *31*, 419–424.
- Ono, S., Schwartz, I.D., Mueller, O.T., Root, A.W., Usala, S.J., and Bercu, B.B. (1991). Homozygosity for a dominant negative thyroid hormone receptor gene responsible for generalized resistance to thyroid hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *73*, 990–994.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Chiamolera, M.I., Pazos-Moura, C.C., and Wondisford, F.E. (2016). Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Compr. Physiol.* *6*, 1387–1428.
- O’Shea, P.J., Harvey, C.B., Suzuki, H., Kaneshige, M., Kaneshige, K., Cheng, S.-Y., and Williams, G.R. (2003). A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 1410–1424.
- Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C., and Taketo, M. (1995). Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4482–4486.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.* *8*, 1711–1717.
- Park, S.Y., Gönen, M., Kim, H.J., Michor, F., and Polyak, K. (2010). Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J. Clin. Invest.* *120*, 636–644.
- Pascual, A., and Aranda, A. (2013). Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 3908–3916.
- Patai, Á.V., Valcz, G., Hollósi, P., Kalmár, A., Péterfia, B., Patai, Á., Wichmann, B., Spisák, S., Barták, B.K., Leiszter, K., et al. (2015). Comprehensive DNA Methylation Analysis Reveals a Common Ten-Gene Methylation Signature in Colorectal Adenomas and Carcinomas. *PloS One* *10*, e0133836.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* *17*, 1709–1713.
- Plateroti, M., Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Freund, J.N., Samarut, J., and Kedinger, M. (1999). Involvement of T3Ralpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* *116*, 1367–1378.
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.-N., Samarut, J., and Chassande, O. (2001). Functional Interference between Thyroid Hormone Receptor α (TR α) and

Natural Truncated TR $\Delta\alpha$ Isoforms in the Control of Intestine Development. *Mol. Cell Biol.* *21*, 4761–4772.

Plateroti, M., Kress, E., Mori, J.I., and Samarut, J. (2006). Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* *26*, 3204–3214.

Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Washington, M.K., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S.E., et al. (2012). The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* *149*, 146–158.

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* *359*, 235–237.

Puzianowska-Kuznicka, M., Krystyniak, A., Madej, A., Cheng, S.-Y., and Nauman, J. (2002). Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 1120–1128.

Quesada, C.F., Kimata, H., Mori, M., Nishimura, M., Tsuneyoshi, T., and Baba, S. (1998). Piroxicam and acarbose as chemopreventive agents for spontaneous intestinal adenomas in APC gene 1309 knockout mice. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* *89*, 392–396.

Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* *418*, 934–934.

Ramachandran, I., Ganapathy, V., Gillies, E., Fonseca, I., Sureban, S.M., Houchen, C.W., Reis, A., and Queimado, L. (2014). Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis.* *5*, e1246.

Ramsbottom, S.A., and Pownall, M.E. (2016). Regulation of Hedgehog Signalling Inside and Outside the Cell. *J. Dev. Biol.* *4*, 23.

Randall, D.J., Burggren, W.W., French, K., and Eckert, R. (2002). *Eckert animal physiology : mechanisms and adaptations* (New York: W.H. Freeman and Co.).

Rangaswami, H., Marathe, N., Zhuang, S., Chen, Y., Yeh, J.-C., Frangos, J.A., Boss, G.R., and Pilz, R.B. (2009). Type II cGMP-dependent Protein Kinase Mediates Osteoblast Mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* *284*, 14796–14808.

Rangaswami, H., Schwappacher, R., Marathe, N., Zhuang, S., Casteel, D.E., Haas, B., Chen, Y., Pfeifer, A., Kato, H., Shattil, S., et al. (2010). Cyclic GMP and Protein Kinase G Control a Src-Containing Mechanosome in Osteoblasts. *Sci Signal* *3*, ra91-ra91.

Rangaswami, H., Schwappacher, R., Tran, T., Chan, G.C., Zhuang, S., Boss, G.R., and Pilz, R.B. (2012). Protein Kinase G and Focal Adhesion Kinase Converge on Src/Akt/ β -Catenin Signaling Module in Osteoblast Mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* *287*, 21509–21519.

Reichling, T., Goss, K.H., Carson, D.J., Holdcraft, R.W., Ley-Ebert, C., Witte, D., Aronow, B.J., and Groden, J. (2005). Transcriptional profiles of intestinal tumors in Apc(Min) mice are

unique from those of embryonic intestine and identify novel gene targets dysregulated in human colorectal tumors. *Cancer Res.* *65*, 166–176.

Rennert, G., Rennert, H.S., Pinchev, M., and Gruber, S.B. (2010). A case-control study of levothyroxine and the risk of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *102*, 568–572.

Rimkus, T.K., Carpenter, R.L., Qasem, S., Chan, M., and Lo, H.-W. (2016). Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers* *8*.

Rodriguez-Salas, N., Dominguez, G., Barderas, R., Mendiola, M., García-Albéniz, X., Maurel, J., and Batlle, J.F. (2017). Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *109*, 9–19.

Russnes, H.G., Navin, N., Hicks, J., and Borresen-Dale, A.-L. (2011). Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *J. Clin. Invest.* *121*, 3810–3818.

Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homicsko, K., Collisson, E.A., Gibb, W.J., Wullschleger, S., Ostos, L.C.G., Lannon, W.A., Grotzinger, C., Del Rio, M., et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.* *19*, 619–625.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* *21*, 1–26.

Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* *40*, 915–920.

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.

Sawa, H. (2012). Control of cell polarity and asymmetric division in *C. elegans*. *Curr. Top. Dev. Biol.* *101*, 55–76.

Schneider, M.J., Fiering, S.N., Pallud, S.E., Parlow, A.F., St Germain, D.L., and Galton, V.A. (2001). Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (*DIO2*) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *15*, 2137–2148.

Schneider, M.J., Fiering, S.N., Thai, B., Wu, S., St Germain, E., Parlow, A.F., St Germain, D.L., and Galton, V.A. (2006). Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (*Dio1*) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* *147*, 580–589.

Schoenmakers, N., Moran, C., Peeters, R.P., Visser, T., Gurnell, M., and Chatterjee, K. (2013). Resistance to thyroid hormone mediated by defective thyroid hormone receptor alpha. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 4004–4008.

Schuijers, J., and Clevers, H. (2012). Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, *Lgr5* and R-spondins. *EMBO J.* *31*, 2685.

- Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., et al. (2013). Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell* *152*, 25–38.
- Scoville, D.H., Sato, T., He, X.C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* *134*, 849–864.
- Segditsas, S., Rowan, A.J., Howarth, K., Jones, A., Leedham, S., Wright, N.A., Gorman, P., Chambers, W., Domingo, E., Roylance, R.R., et al. (2009). APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene* *28*, 146–155.
- Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* *29*, 625–634.
- Serafino, A., Moroni, N., Zonfrillo, M., Andreola, F., Mercuri, L., Nicotera, G., Nunziata, J., Ricci, R., Antinori, A., Rasi, G., et al. (2014). WNT-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer. *Oncotarget* *5*, 978–992.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* *138*, 822–829.
- Shi, Y., He, B., Kuchenbecker, K.M., You, L., Xu, Z., Mikami, I., Yagui-Beltran, A., Clement, G., Lin, Y.-C., Okamoto, J., et al. (2007). Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* *121*, 1175–1181.
- Shi, Y.B., Fu, L., Hsia, S.C., Tomita, A., and Buchholz, D. (2001). Thyroid hormone regulation of apoptotic tissue remodeling during anuran metamorphosis. *Cell Res.* *11*, 245–252.
- Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M., Date, S., Sugimoto, S., Kanai, T., and Sato, T. (2017). Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells. *Nature* *545*, 187–192.
- Shimomura, Y., Agalliu, D., Vonica, A., Luria, V., Wajid, M., Baumer, A., Belli, S., Petukhova, L., Schinzel, A., Brivanlou, A.H., et al. (2010). *Apcdd1* is a novel Wnt inhibitor Mutated in Hereditary Hypotrichosis Simplex. *Nature* *464*, 1043.
- Shirasawa, S., Furuse, M., Yokoyama, N., and Sasazuki, T. (1993). Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* *260*, 85–88.
- Shoemaker, J.P., Bradley, R.L., and Hoffman, R.V. (1976). Increased Survival and Inhibition of Mammary Tumors in Hypothyroid Mice. *J. Surg. Res.* *21*, 151–154.
- Shroyer, N.F., Wallis, D., Venken, K.J.T., 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.
- Shu, X., Ji, J., Li, X., Sundquist, J., Sundquist, K., and Hemminki, K. (2010). Cancer risk in patients hospitalised for Graves' disease: a population-based cohort study in Sweden. *Br. J. Cancer* *102*, 1397–1399.

- Siegrist-Kaiser, C.A., Juge-Aubry, C., Tranter, M.P., Ekenbarger, D.M., and Leonard, J.L. (1990). Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* *265*, 5296–5302.
- Siesser, W.B., Cheng, S., and McDonald, M.P. (2005). Hyperactivity, impaired learning on a vigilance task, and a differential response to methylphenidate in the TRbetaPV knock-in mouse. *Psychopharmacology (Berl.)* *181*, 653–663.
- Silva, A.-L., Dawson, S.N., Arends, M.J., Guttula, K., Hall, N., Cameron, E.A., Huang, T.H.-M., Brenton, J.D., Tavaré, S., Bienz, M., et al. (2014). Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer* *14*, 891.
- Simons, B.D., and Clevers, H. (2011). Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* *145*, 851–862.
- Sinner, D., Kordich, J.J., Spence, J.R., Opoka, R., Rankin, S., Lin, S.-C.J., Jonatan, D., Zorn, A.M., and Wells, J.M. (2007). Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7802–7815.
- Sirakov, M., and Plateroti, M. (2011). The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 938–946.
- Sirakov, M., Kress, E., Nadjar, J., and Plateroti, M. (2014). Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 2897–2907.
- Sirakov, M., Boussouar, A., Kress, E., Frau, C., Lone, I.N., Nadjar, J., Angelov, D., and Plateroti, M. (2015). The thyroid hormone nuclear receptor TR α 1 controls the Notch signaling pathway and cell fate in murine intestine. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 2764–2774.
- Skah, S., Nadjar, J., Sirakov, M., and Plateroti, M. (2015). The secreted Frizzled-Related Protein 2 modulates cell fate and the Wnt pathway in the murine intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* *330*, 56–65.
- Skah, S., Uchuya-Castillo, J., Sirakov, M., and Plateroti, M. (2017). The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/ β -catenin pathway: An intriguing liaison. *Dev. Biol.* *422*, 71–82.
- de Sousa e Melo, F., Kurtova, A.V., Harnoss, J.M., Kljavin, N., Hoeck, J.D., Hung, J., Anderson, J.E., Storm, E.E., Modrusan, Z., Koeppen, H., et al. (2017). A distinct role for Lgr5(+) stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* *543*, 676–680.
- Spitzner, M., Emons, G., Kramer, F., Gaedcke, J., Rave-Fränk, M., Scharf, J.-G., Burfeind, P., Becker, H., Beissbarth, T., Ghadimi, B.M., et al. (2010). A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *78*, 1184–1192.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., and McMahon, A.P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* *372*, 679–683.

- Sterling, K., Brenner, M.A., and Sakurada, T. (1980). Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo. *Science* 210, 340–342.
- Su, Y., Damjanovski, S., Shi, Y., and Shi, Y.B. (1999). Molecular and cellular basis of tissue remodeling during amphibian metamorphosis. *Histol. Histopathol.* 14, 175–183.
- Suraweera, N., Robinson, J., Volikos, E., Guenther, T., Talbot, I., Tomlinson, I., and Silver, A. (2006). Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. *Int. J. Cancer* 119, 1837–1842.
- Suzuki, H., and Cheng, S. (2003). Compensatory Role of Thyroid Hormone Receptor (TR) α 1 in Resistance to Thyroid Hormone: Study in Mice with a Targeted Mutation in the TR β Gene and Deficient in TR α 1. *Mol. Endocrinol.* 17, 1647–1655.
- Suzuki, K., Fukui, H., Kayahara, T., Sawada, M., Seno, H., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., and Chiba, T. (2005). Hes1-deficient mice show precocious differentiation of Paneth cells in the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 348–352.
- Suzuki, R., Miyamoto, S., Yasui, Y., Sugie, S., and Tanaka, T. (2007). Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer* 7, 84.
- Takahashi, M., Fujita, M., Furukawa, Y., Hamamoto, R., Shimokawa, T., Miwa, N., Ogawa, M., and Nakamura, Y. (2002). Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-Catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 5651–5656.
- 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.
- Taniguchi, H., Yamamoto, H., Hirata, T., Miyamoto, N., Oki, M., Noshio, K., Adachi, Y., Endo, T., Imai, K., and Shinomura, Y. (2005). Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 24, 7946–7952.
- Tata, J.R. (2006). Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 10–20.
- 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.
- Tian, H., Biehs, B., Chiu, C., Siebel, C.W., Wu, Y., Costa, M., de Sauvage, F.J., and Klein, O.D. (2015). Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell Rep.* 11, 33–42.
- Tinnikov, A., Nordström, K., Thorén, P., Kindblom, J.M., Malin, S., Rozell, B., Adams, M., Rajanayagam, O., Pettersson, S., Ohlsson, C., et al. (2002). Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor alpha1. *EMBO J.* 21, 5079–5087.
- Tosovic, A., Bondeson, A.-G., Bondeson, L., Ericsson, U.-B., Malm, J., and Manjer, J. (2010).

Prospectively measured triiodothyronine levels are positively associated with breast cancer risk in postmenopausal women. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R33.

Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Di Consiglio, E., Testai, E., and Stammati, A. (2011). Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 25, 13–20.

Ushiyama, S., Ishimaru, Y., Narukawa, M., Yoshioka, M., Kozuka, C., Watanabe, N., Tsunoda, M., Osakabe, N., Asakura, T., Masuzaki, H., et al. (2016). Catecholamines Facilitate Fuel Expenditure and Protect Against Obesity via a Novel Network of the Gut-Brain Axis in Transcription Factor Skn-1-deficient Mice. *EBioMedicine* 8, 60–71.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314–322.

Wagner, M.S., Wajner, S.M., Dora, J.M., and Maia, A.L. (2007). Regulation of Dio2 gene expression by thyroid hormones in normal and type 1 deiodinase-deficient C3H mice. *J. Endocrinol.* 193, 435–444.

Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D., and Fletterick, R.J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378, 690–697.

Wang, D., Huang, B., Zhang, S., Yu, X., Wu, W., and Wang, X. (2013). Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes Dev.* 27, 1339–1344.

Wang, N., Wang, Z., Wang, Y., Xie, X., Shen, J., Peng, C., You, J., Peng, F., Tang, H., Guan, X., et al. (2015). Dietary compound isoliquiritigenin prevents mammary carcinogenesis by inhibiting breast cancer stem cells through WIF1 demethylation. *Oncotarget* 6, 9854–9876.

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.

Weiss, R.E., and Refetoff, S. (2000). Resistance to thyroid hormone. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 1, 97–108.

Wen, L., Shibata, Y., Su, D., Fu, L., Luu, N., and Shi, Y.-B. (2017). Thyroid Hormone Receptor α Controls Developmental Timing and Regulates the Rate and Coordination of Tissue-Specific Metamorphosis in *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology* 158, 1985–1998.

Westphalen, C.B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D.J., Nuber, A.H., Brandtner, A., Setlik, W., Remotti, H., Muley, A., et al. (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. *J. Clin. Invest.* 124, 1283–1295.

van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789–799.

Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth

factors. *Nature* 423, 448–452.

Williams, G.R., Harney, J.W., Forman, B.M., Samuels, H.H., and Brent, G.A. (1991). Oligomeric binding of T3 receptor is required for maximal T3 response. *J. Biol. Chem.* 266, 19636–19644.

Wirth, E.K., Roth, S., Blechschmidt, C., Hölter, S.M., Becker, L., Racz, I., Zimmer, A., Klopstock, T., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., et al. (2009). Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9439–9449.

Wolman, S.R., and Heppner, G.H. (1992). Genetic heterogeneity in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 469–470.

Wong, G.T., Manfra, D., Poulet, F.M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J.S., Lee, H.-J.J., et al. (2004). Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 279, 12876–12882.

Wong, V.W.Y., Stange, D.E., Page, M.E., Buczacki, S., Wabik, A., Itami, S., van de Wetering, M., Poulson, R., Wright, N.A., Trotter, M.W.B., et al. (2012). Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat. Cell Biol.* 14, 401–408.

Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., et al. (2007). The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 318, 1108–1113.

Wu, C., Qiu, S., Lu, L., Zou, J., Li, W., Wang, O., Zhao, H., Wang, H., Tang, J., Chen, L., et al. (2014). RSP02-LGR5 signaling has tumour-suppressive activity in colorectal cancer. *Nat. Commun.* 5, 3149.

Xu, J.-H., Yang, H.-P., Zhou, X.-D., Wang, H.-J., Gong, L., and Tang, C.-L. (2015). Role of Wnt Inhibitory Factor-1 in Inhibition of Bisdemethoxycurcumin Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Highly Metastatic Lung Cancer 95D Cells. *Chin. Med. J. (Engl.)* 128, 1376–1383.

Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., and Wilkinson, D.G. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 399, 267–271.

Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., and Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin. J. Cancer* 35, 4.

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., Janda, C.Y., Chang, J., Zheng, G.X.Y., Larkin, K.A., Luca, V.C., Chia, L.A., Mah, A.T., Han, A., Terry, J.M., et al. (2017). Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during

Lgr5(+) intestinal stem-cell self-renewal. *Nature* 545, 238–242.

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, Y., Zhu, R., Bai, J., Zhang, X., Tian, Y., Li, X., Peng, Z., He, Y., Chen, L., Ji, Q., et al. (2011). Numb modulates intestinal epithelial cells toward goblet cell phenotype by inhibiting the Notch signaling pathway. *Exp. Cell Res.* 317, 1640–1648.

Ye, Y.-W., Wu, J.-H., Wang, C.-M., Zhou, Y., Du, C.-Y., Zheng, B.-Q., Cao, X., Zhou, X.-Y., Sun, M.-H., and Shi, Y.-Q. (2011). Sox17 regulates proliferation and cell cycle during gastric cancer progression. *Cancer Lett.* 307, 124–131.

Yen, P.M. (2003). Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 14, 327–333.

Yen, P.M., Ando, S., Feng, X., Liu, Y., Maruvada, P., and Xia, X. (2006). Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 121–127.

Yousefi, M., Li, L., and Lengner, C.J. (2017). Hierarchy and Plasticity in the Intestinal Stem Cell Compartment. *Trends Cell Biol.*

Yu, N., Zhu, H., Tao, Y., Huang, Y., Song, X., Zhou, Y., Li, Y., Pei, Q., Tan, Q., and Pei, H. (2016). Association between prognostic survival of human colorectal carcinoma and ZNRF3 expression. *OncoTargets Ther.* 9, 6679–6687.

Zamani, M., Hosseini, S.V., and Mokarram, P. (2016). Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 1–10.

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

Zhang, L., and Shay, J.W. (2017). Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 109.