HAL
open science

Étude du rôle de la Nétrine-1 dans l'ontogénèse et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal murin

Pauline Vieugué

To cite this version:

Pauline Vieugué. Étude du rôle de la Nétrine-1 dans l'ontogénèse et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal murin. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1283 . tel-02003609

HAL Id: tel-02003609

https://theses.hal.science/tel-02003609v1

Submitted on 1 Feb 2019

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 : 2017LYSE1283

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

Ecole Doctorale ED340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue publiquement le 15/12/2017, par :
Pauline VIEUGUÉ

Étude du rôle de la Nétrine-1 dans l'ontogénèse et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal murin.

Devant le jury composé de :

BERNET Agnès	Professeur, UCBL1, Lyon	Présidente
FREUND Jean-Noël	DR1, Université de Strasbourg	Rapporteur
PANNEQUIN Julie	CR1, IGF, Montpellier	Rapporteure
CHÉDOTAL Alain	DR1, Institut de la vision, Paris	Examinateur
ROBINE Sylvie	DR1, Institut Curie, Paris	Examinatrice
MEHLEN Patrick	DREx, CRCL, Lyon	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

« La difficulté de réussir ne fait qu'ajouter à la nécessité d'entreprendre »

Pierre-Augustin Caron de Beaumarchais

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury : le Pr Agnès Bernet, le Dr Alain Chédotal, le Dr Jean-Noël Freund, le Dr Julie Pannequin et le Dr Sylvie Robine, qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie particulièrement le Pr Agnès Bernet pour avoir si gentiment accepté de présider ce jury ainsi que les Dr Jean-Noël Freund et Julie Pannequin pour le temps accordé à la lecture approfondie et critique de ce manuscrit.

J'adresse également mes remerciements très chaleureux aux membres de mon comité de suivi de thèse : le Dr Michela Plateroti et le Dr Sylvie Robine, pour leur disponibilité, leur soutien et leurs conseils si précieux. Merci de m'avoir accompagnée pendant ces quatre années de thèse.

Un remerciement spécial à Patrick pour m'avoir si bien accueillie dans son laboratoire, il y a 5 ans maintenant, et pour m'avoir donné l'opportunité d'y effectuer ma thèse. Même si cette aventure ne fut pas toujours des plus simples et que le manque de résultats positifs a parfois entamé mon moral tu as toujours gardé ton optimisme et ta bonne humeur légendaire et as su me manifester ta confiance. J'espérais sincèrement que mon travail et ma persévérance aideraient à faire tourner la roue, mais ça n'a malheureusement pas suffit. Merci de m'avoir donné les meilleures conditions de travail possibles et de m'avoir permis de rester si longtemps. J'ai énormément appris et sors de cette thèse enrichie.

Je remercie bien sûr l'ensemble de l'équipe Mehlen, ancienne et nouvelle, pour ces cinq années passées à vos côtés, pour les conclaves et les barbecues partagés.

Un immense merci à Nico pour tout ce que tu as fait pour moi, ainsi que pour tout ce que tu fais pour le labo. Merci de m'avoir tant appris : la gestion des souris, les coupes au cryostat, les IF, les hybridations in situ, … Sans toi je n'aurais probablement pas fait la moitié des manips de ma thèse. Dommage que tu ne sois pas revenu plus tôt. Merci vraiment, pour ta gentillesse, ta disponibilité, ta patience, ton soutien, tes réponses à mes innombrables questions, ton aide technique et informatique. Mais également pour ta rigueur, ta curiosité scientifique et la relecture de ce manuscrit. Il n'y a pas de mot pour te dire à quel point je te suis reconnaissante, tu as été un pilier et m'a permis de ne jamais lâcher. Alors tout simplement merci !!!

Jojo, un très grand merci à toi aussi. Du premier jour de mon master jusqu'à mon dernier jour de thèse, tu auras été là dans ton soutien et dans la correction de mes écrits et oraux. Malgré ton emploi du temps si chargé et bien que je n'ai jamais été ton étudiante, tu as toujours su trouver le temps pour m'aider et me conseiller. Merci aussi pour ta bonne humeur quotidienne, ton rire si communicatif, ton franc parler et merci de t'inquiéter de savoir si je suis bien chaussée.

Merci à Shushu et Duygu qui sont arrivées et repartent en même temps que moi. Quel plaisir de vous avoir eu à mes côtés tout au long de cette aventure et d'avoir affronté les épreuves ensemble. Plein de bonheur et de réussite pour vos post-docs respectifs !

Merci à Ana, Duygu, Mélissa et Stephany pour les soirées pizzas, tapas, burgers, fromages et vins rouges, partagées après les longues journées de travail.

À la « jeunesse » : Mélissa, Jéro, Stephany, Justine, Anna Rita, Ambroise, et Giacomo (pas tout à fait Mehlen mais accepté quand même) pour la bonne humeur que vous apportez au labo, votre bienveillance, et les nombreuses soirées passées à vos côtés à rigoler et bien manger, grâce à Shushu notre chef presque étoilé.

Merci Robert et Pauline M. pour votre soutien sans faille, votre aide et nos nombreuses discussions, scientifiques ou non, autour d'un café. Merci de m'avoir si bien accueillie au 5ème pour que je puisse y faire mes cultures d'organoïdes dans les meilleures conditions. Et merci aussi pour les sorties ski qui, je l'espère ne sont pas finies !

À Cathy, Blabla et Nini qui sont là depuis le début. Merci pour votre bienveillance, et pour être de ceux sur qui on peut toujours compter !

Merci à Bibi, Sophie et Quynh pour votre travail administratif indispensable. Bibi, merci pour ton investissement, ta patience ainsi que ta réactivité face à nos commandes incessantes et toujours urgentes.

Aux anciens : Clélia, Solen, Lise et Céline S., pour le bout du chemin, plus ou moins long, parcouru à vos côtés et pour continuer, même de loin, à me manifester votre soutien.

Fab, un très grand merci à toi également, sans qui le début de cette aventure n'aurait pas été le même. Merci pour tout ce que tu m'as appris lorsque tu étais post-doc au labo, pour la rigueur que tu m'as inculquée et qui fait aujourd'hui de moi une vraie toquée des contrôles, pour tes conseils avisés si nombreux et précieux, ainsi que pour ton soutien qui m'a permis d'avancer. Ta passion pour les cellules souches, ta capacité de travail et ta détermination ont été une vraie inspiration. Plein de belles réussites à ta toute jeune équipe.

Un merci tout particulier justement, aux Laviaux : Aurélia, Pauline W., et Giacomo notamment, pour votre soutien quotidien, les pots, apéros et restos. Le grain de folie qui habite chacun d'entre vous (grain un peu plus développé chez certains que chez d'autres), votre franchise et vos histoires inépuisables m'auront vraiment beaucoup fait rire.

À Gabi, qui à mon arrivée au labo était doctorant, et qui est de retour au centre depuis peu, en tant que chef d'équipe. Merci pour m'avoir si bien intégrée il y a 5 ans, et merci pour

ton soutien, tes encouragements, et ton coaching pour faire des figures, en cette fin de thèse. Courage et bonne chance pour ton équipe naissante.

Merci à Matthias et Amina pour leurs conseils pour la culture d'organoïdes.

A Scott, pour la formidable aventure que j'ai vécue à San Francisco il y a quelques années. Merci pour m'avoir initiée à la recherche et donné l'envie de continuer. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, tes encouragements et ta façon de voir la science. Je n'oublie pas ton : « si une expérience ne fonctionne pas, ce n'est pas de la faute de tes mains, mais de la façon dont on l'a pensée», qui m'aide tant à persévérer. Merci évidemment à ma Colinette pour m'avoir donné l'opportunité de travailler avec toi, pour tout ce que tu m'as appris, mais aussi pour ton accueil si chaleureux et tous ces moments partagés. A mes post-docs adorés Dong et MT. Vous avez fait de mon expérience américaine une expérience inoubliable!!! Merci pour votre amitié si précieuse. Il me tarde de vous revoir quelque part en Europe !!

À mes amis lyonnais de longue date : Marie, Pilou, Mélanie, Simon, Claire, Nelly, Dams, Gaby et Clo, merci pour votre soutien, votre amitié sans faille ainsi que pour les soirées et weekends si ressourçants. Vous avoir auprès de moi est une vraie force.

Aux compas : Juju, Marie, Clem et Patrick ainsi qu'à Laëtitia et Benoït, présents depuis de nombreuses années et toujours les mêmes. Même si nos soirées lasagnes se font trop rares, elles sont précieuses et toujours un vrai retour aux sources. Merci pour cette aventure malienne qui m'a rendue forte, pour tous les moments légers emplis de rire, pour votre façon de voir la vie et votre soutien.

Merci aux danseuses de Streetjazz pour tous les bons moments passés à vos côtés et pour l'équilibre que vous m'apportez depuis trois ans. Manu, un très grand merci pour ton soutien, ton grain de folie et toutes tes histoires improbables et intarissables !!

Un immense merci à ma famille, soutien indéfectible depuis toujours. Merci pour votre présence, votre écoute, vos encouragements et pour respecter mes choix, parfois difficiles à comprendre pour les personnes extérieures à la recherche. Je mesure la chance d'avoir pu réaliser ma thèse à quelques pas de la maison, véritable bulle de réconfort. Merci aussi à Eileen, ma nièce, mon antidépresseur, qui depuis 3 ans m'apporte tant.

Enfin, merci aux souris, compagnons fidèles de mes journées et dimanche soirs, qui au prix de leur vie ont contribué à ma formation, à la réalisation de ma thèse et m'ont fait découvrir le monde passionnant du développement.

Merci à tous.

RESUME

L'épithélium intestinal adulte des mammifères est un tissu hautement organisé entièrement renouvelé tous les 5 à 7 jours, grâce à la présence de cellules souches intestinales (CSI). Localisées à la base des cryptes, les CSI sont capables de s'auto-renouveler et de générer l'ensemble des types cellulaires de ce tissu. Afin de préserver l'équilibre entre leur auto-renouvellement et leur différenciation, véritable garant de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, les CSI résident dans un microenvironnement finement régulé, « la niche », leur procurant l'ensemble des signaux nécessaires à leurs fonctions. La Nétrine-1, molécule sécrétée et apparentée à la famille des Laminines, est exprimée dans l'environnement des cryptes intestinales, mais également au cours du développement intestinal. Initialement découverte pour son rôle dans le guidage axonal, cette protéine est à ce jour considérée comme une molécule pléïotropique impliquée dans divers processus physiologiques tels que la morphogénèse, la migration, l'adhésion cellulaire, la prolifération mais également pathologiques comme la tumorigénèse. Considérant ces observations nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel de la Nétrine-1 dans la régulation du compartiment souche intestinal adulte, ainsi que lors de l'ontogénèse intestinale. Dans une première partie, nous montrons qu'*ex vivo* la Nétrine-1 promeut la croissance des entéroïdes et régule l'expression génique de certains marqueurs spécifiques des CSI. Dans une seconde partie, nous montrons, grâce à la génération et caractérisation de nouveaux modèles murins, que la Nétrine-1 est impliquée dans le développement de l'épithélium intestinal grêle et que sa délétion conduit à un retard d'émergence des villi.

Mots clés : Nétrine-1, Epithélium intestinal, Cellules souches intestinales, Homéostasie, Développement.

ABSTRACT

The adult intestinal epithelium is a highly organized tissue, which is completely self-renewed every 5 to 7 days, due to a pool of multipotent intestinal stem cells (ISC). Located at the base of intestinal crypts, ISC have the ability to self- renew and to give rise to all epithelial intestinal cell types. To preserve the balance between their self-renewal and their differentiation, and therefore to maintain the epithelial tissue homeostasis, ISC reside in a tightly regulated microenvironment - called "niche"- that provides them all factors required for their functions. Netrin-1, a laminin-related secreted protein, is expressed in the microenvironment of the crypt, and is also expressed during intestinal development. Initially described as an axonal guidance cue, Netrin-1 is now considered as a pleiotropic molecule involved in many different processes such as morphogenesis, cell migration, cell adhesion, proliferation and also tumorigenesis. Based on these observations, we hypothesized that Netrin-1 could play a role in the maintenance of the adult intestinal stem cell compartment, and also in the intestinal ontogenesis. In a first part, we showed that Netrin-1 promotes the growth of enteroids *ex vivo* while regulating gene expression of specific intestinal stem cell markers. In the second part, we demonstrated, by using two novel genetically engineered mouse models, that Netrin-1 is involved in the embryonic development of the intestinal epithelium and that its deletion leads to a delay in villi emergence.

Keywords: Netrin-1, Intestinal epithelium, Intestinal stem cells, Homeostasis, Development.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 4

RESUME 7

ABSTRACT 8

SOMMAIRE 9

LISTE DES ABREVIATIONS 13

LISTE DES FIGURES 16

LISTE DES TABLES 18

INTRODUCTION 19

CHAPITRE 1 : L'EPITHELIUM DE L'INTESTIN GRELE EMBRYONNAIRE ET ADULTE 20

I. ORGANISATION GENERALE DE L'INTESTIN GRELE ADULTE 20
1. La séreuse 20
2. La musculeuse 21
3. La sous-muqueuse 21
4. La muqueuse 21

II. L'EPITHELIUM DE L'INTESTIN GRELE : UN TISSU FINEMENT ORGANISE 22
A. Organisation structurelle de l'épithélium de l'intestin grêle adulte 22
1. Les cellules souches intestinales (CSI) 22
2. Les cellules d'amplification transitoire (TA) 23
3. Les cellules sécrétrices 23
4. Les cellules absorptives 24
5. Les autres types cellulaires 25
B. Ontogénèse de l'épithélium intestinal chez la souris 25
1. Emergence des villi 26
2. Emergence des cryptes 28

CHAPITRE 2 : LES CELLULES SOUCHES INTESTINALES ADULTES ET LEUR NICHE 30

I. IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES ADULTES 30
A. Les cellules souches intestinales CBC 31
B. Les cellules intestinales « + 4 », des cellules souches de secours ? 33

II. PLASTICITE CELLULAIRE DU COMPARTIMENT SOUCHE INTESTINAL 34

III. ORIGINE DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES ADULTES LGR5+ 35
IV. LA NICHE DES CELLULES SOUCHES INTESTINALES ADULTES : UN EQUILIBRE FIN ENTRE DIFFERENCIATION ET PROLIFERATION 36
A. Voies de signalisation au sein de la niche des CSI 36
1. La voie de signalisation Wnt 36
2. La voie de signalisation Notch 38
3. La voie de signalisation des Bmp 40
4. La voie de signalisation Egf 40
5. La voie de signalisation Hedgehog 41
B. Les cellules actrices de la niche des CSI 42
1. Les cellules de Paneth 42
2. Les cellules stromales de la *lamina propria* 43
V. LA CULTURE DE CSI *EX VIVO :* APPORTS FONDAMENTAUX ET THERAPEUTIQUES 45

CHAPITRE 3 : LA NETRINE-1 ET SES RECEPTEURS 48
I. LA FAMILLE DES NETRINES : ÉVOLUTION ET STRUCTURES 49
A. La famille des Nétrines et son évolution 49
B. Caractéristiques structurales des Nétrines 50
II. LES RECEPTEURS A LA NETRINE-1 51
A. Principaux récepteurs à la Nétrine-1 51
1. Dcc 51
2. Néogénine 53
3. La famille des récepteurs Unc5 54
B. Autres récepteurs à la Nétrine-1 56
1. Dscam 56
2. Les intégrines α6β4 et α3β1 57
3. A2b 57
4. App 58
III. ROLES FONCTIONNELS DE LA NETRINE-1 ET DE SES RECEPTEURS 59
A. Dans le système nerveux central : une molécule de guidage axonal et de migration neuronale. 59
- **La Nétrine-1 : une molécule de guidage axonal** 59
- **La Nétrine-1 : une molécule de migration neuronale** 61
C. Dans le système nerveux périphérique : une molécule de guidage axonal et de migration neuronale. 62
D. En dehors du système nerveux : une molécule pléïotropique 62
E. La Nétrine-1 une molécule de survie via ses récepteurs à dépendance 64
- **Les récepteurs à dépendance au cours du développement embryonnaire** 65
- **Les récepteurs à dépendance au cours de la tumorigénèse** 66

CHAPITRE 4 : NETRINE-1 ET INTESTIN 67
I. NETRINE-1/DCC, UN COUPLE REQUIS A LA FORMATION DES PLEXI SOUS MUQUEUX DU SYSTEME NERVEUX ENTERIQUE. 67
II. NETRINE-1/DCC UN COUPLE IMPLIQUE DANS LA SURVIE DES CELLULES DE L'EPITHELIUM INTESTINAL 68
III. NETRINE-1/DCC UN EQUILIBRE REQUIS A L'HOMEOSTASIE INTESTINALE 69

RESULTATS **71**

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE THESE **72**

VALIDATION DES LIGNEES MURINES **75**

I. GENERATION ET VALIDATION DE LA LIGNEE MURINE D'INVALIDATION CONDITIONNELLE DE LA *NETRINE-1* 75

II. GENERATION ET VALIDATION DU MODELE MURIN DE SUREXPRESSION CONDITIONNELLE DE *NETRINE-1* 77

NETRINE-1 ET CSI ADULTES **78**

I. CONSEQUENCES DE LA PERTE DE NETRINE-1 DANS L'EPITHELIUM INTESTINAL ADULTE SUR LE COMPARTIMENT SOUCHE. 78

A. In vivo, la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte n'altère pas le nombre de cellules souches intestinales Lgr5⁺ par crypte. *78*

B. In vivo, la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte augmente l'expression de certains marqueurs spécifiques des CSI. *79*

C. La Nétrine-1 de l'épithélium intestinal : une source unique de Nétrine-1 dans l'intestin grêle adulte? *80*

II. CONSEQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE NETRINE-1 DANS L'EPITHELIUM INTESTINAL ADULTE SUR LE COMPARTIMENT SOUCHE. 83

A. In vivo le gain de Nétrine-1 dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte n'altère pas le nombre de CSI Lgr5⁺ par crypte. *83*

B. In vivo la surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte n'affecte pas le profil d'expression génique des CSI. *83*

C. Ex vivo, le gain de Nétrine-1 augmente l'expression des marqueurs souches et accélère la croissance des organoïdes. *84*

ROLE DE LA NETRINE-1 AU COURS DE L'ONTOGENESE INTESTINALE **86**

I. PROFILS D'EXPRESSION DE LA NETRINE-1 ET DE SES RECEPTEURS AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'INTESTIN GRELE. 86

A. Dans l'intestin foetal la forte expression de Nétrine-1 est accompagnée d'une forte expression des récepteurs Néogénine, Unc5-B et –C. *86*

II. CONSEQUENCES DE LA MODULATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE NETRINE-1 SUR L'ONTOGENESE INTESTINALE. 89

A. La perte de Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire retarde l'ontogénèse de l'épithélium intestinal et l'émergence des villi. *89*

B. La surexpression de Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire module l'expression du récepteur Néogénine sans induire de conséquence phénotypique évidente à E15.5. *92*

PROCEDURES EXPERIMENTALES **93**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **99**

I. PROFILS D'EXPRESSION DE LA NETRINE-1 ET DE SES RECEPTEURS DANS L'INTESTIN GRELE EN DEVELOPPEMENT ET ADULTE. 100

A. La Nétrine-1 : une molécule sécrétée par les cellules du mésenchyme ? 100

B. L'établissement des profils d'expression des récepteurs à la Nétrine-1 dans l'intestin grêle fœtal et adulte : vers une meilleure compréhension des mécanismes orchestrés par cette molécule. 102

II. LA NETRINE-1 : UNE MOLECULE IMPLIQUEE DANS L'ONTOGENESE DE L'EPITHELIUM INTESTINAL ? 104

III. LA NETRINE-1, UNE MOLECULE IMPLIQUEE DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE DE L'EPITHELIUM INTESTINAL ADULTE ? 107

A. Quelles stratégies expérimentales pour étudier le rôle de la Nétrine-1 dans l'intestin grêle adulte? 107

B. Quels rôles pour la Nétrine-1 dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal adulte ? 108

1. La Nétrine-1 : une molécule régulant les fonctions des CSI de façon directe? 110
2. La Nétrine-1 : une molécule contrôlant les cellules de la niche des CSI ? 111
3. La Nétrine-1 : une molécule régulant les propriétés de la lame basale de l'épithélium intestinal ? 112
4. La Nétrine-1 : une molécule impliquée dans la tumorigénèse intestinale. 113

BIBLIOGRAPHIE **115**

ANNEXES **135**

Annexe 1: Floor plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. 136

Annexe 2: Netrin-1 bipotent signalling controls both self-renewal and lineage commitment in embryonic stem cells 137

LISTE DES ABREVIATIONS

A2b :	Adenosine 2b Receptor
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
A-Sma :	Alpha Smooth muscle actin
Alpi :	Alkaline phosphatase intestinal
AMPc :	Adenosine Monophosphate cyclique
Apc :	Adenomatous Polyposis Coli
App :	β-Amyloid precursor protein
ARN :	Acide Ribonucléique
Ascl2 :	Ashaete-scute complex homolog 2
Bmi1 :	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
Bmp :	Bone morphogenetic protein
Bmpr :	Bone morphogenetic protein receptor
Brdu :	5-Bromo-2-déoxyuridine
CBC :	Crypt base columnar cell
ChgA :	Chromogranine A
Ck1 :	Casein Kinase 1
Cnx43 :	Connexin 43
CSI :	Cellule Souche Intestinale
DB :	Dcc binding domain
Dcc :	Deleted in Colorectal Cancer
DD :	Death Domain
Dll :	Delta like
Dscam :	Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
DTR :	Diphteria Toxin Receptor
E :	Jour embryonnaire
Edu :	5-Ethynyl-2-déoxyuridine
Egf :	Epidermal Growth Factor
Egfp :	Enhanced Green Fluorescence Protein
Erk1/2 :	Extracellular Related Kinases 1/2

Fgf :	Fibroblast growth Factor
FN III :	Fibronectine type III
Gsk3β :	Glycogen Synthase Kinase 3β
Hes :	Hairy and enhancer of split
Hh :	Hedgehog
hNTN1 :	Human Netrin-1
Hopx :	HOP homeobox
Hprt :	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GPI :	Glycosylphophatidylinositol
Ig :	Immunoglobuline
Ihh :	Indian hedgehog
ISEMF :	Intestinal subepithelial myofibroblast
KO :	Knock-Out
Lef :	Lymphoid enhancer factor
Lgr5 :	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LSL :	LoxP-Stop-LoxP
LRC :	Label Retaining Cell
Lrig1 :	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
Lrp :	Lipoprotein receptor-related protein
Lys1 :	Lysozyme 1
MCI :	Masse Cellulaire Interne
MEC :	Matrice Extra-Cellulaire
Msi1 :	Musashi1
Muc2 :	Mucine 2
N-CAM :	Neural Cell Adhesion Molecule
Nck1 :	Non catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
NICD :	Notch Intracellular Domain
Ntn :	Nétrine
N-WASP :	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein
Oct3/4 :	Octamer binding transcription factor 3/4
Olfm4 :	Olfactomedin 4

P :	Jour post-natal
Pak1 :	p21-activating kinase 1
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PCRq :	PCR quantitative
Pdgf :	Platelet derived growth factor
Pdgfr :	Platelet derived growth factor receptor
Pgk1 :	Phosphoglycerate kinase 1
Ptc :	Patched
Rbpjκ :	Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region
RD :	Récepteur à dépendance
Rgm :	Repulsive Guidance Molecule
Rnf43 :	Ring finger protein 43
Robo :	Roundabout
RT :	Reverse transcription
Shh :	Sonic hedgehog
SNC :	Système Nerveux Central
SNE :	Système Nerveux Entérique
SNP :	Système Nerveux Périphérique
Sox2 :	Sex determining region Y box 2
TA :	Cellule progénitrice d'amplification transitoire
Tcf :	T-cell factor
Tert :	Telomerase reverse transcriptase
Tg :	Transgène
Tnfrsf :	Tumor necrosis factor receptor superfamily
Tsp :	Thrombospondine
Unc :	Uncoordinated
UPA :	Unc-Pidd-Ankyrins
Znrf3 :	Zinc and ring finger 3
ZU-5 :	Zona Occludens-1/Unc5 homology

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de l'intestin humain. 20

Figure 2 : Organisation structurelle de l'intestin grêle adulte. 21

Figure 3 : Organisation de l'épithélium de l'intestin grêle adulte 22

Figure 4 : Ontogénèse de l'épithélium intestinal grêle de souris. 26

Figure 5 : Expérience de « lineage tracing » au sein de l'épithélium intestinal grêle à partir du modèle murin Lgr5-EGFP-CreERT2 ; Rosa26-lox-stop-lox-LacZ. 31

Figure 6 : Organisation des populations de cellules souches intestinales au sein des cryptes en conditions physiologiques. 32

Figure 7 : Plasticité cellulaire au sein des cryptes intestinales après ablation de la population souche CBC Lgr5^{+}. 34

Figure 8 : Signalisation de la voie canonique de Wnt. 37

Figure 9 : Voie de signalisation Notch. 38

Figure 10: La coopération des voies de signalisations Wnt et Notch contrôle l'auto-renouvellement et la différenciation des CSI. 40

Figure 11 : Voies de signalisation au sein de la niche des cellules souches intestinales. 41

Figure 12 : Niche des cellules souches intestinales : signalisations et acteurs. 44

Figure 13 : Cultures *ex vivo* d'entéroïdes, selon la méthode de Sato et *al*. 45

Figure 14 : La famille des Nétrines : structures et évolution. 49

Figure 15: Les Récepteurs à la Nétrine-1. 52

Figure 16: Guidage axonal des neurones commissuraux à la ligne médiane par la Nétrine-1. 59

Figure 17 : Implication du couple Nétrine-1/Néogénine au cours de la morphogénèse de la glande mammaire. 63

Figure 18: Le concept des récepteurs à dépendance. 65

Figure 19: Profil d'expression de la Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire et adulte. 67

Figure 20 : Génération et validation du modèle murin d'invalidation conditionnelle de la Nétrine-1 (Ntn1lox). 76

Figure 21 : Génération et validation du modèle murin de surexpression conditionnelle de la Nétrine-1 humaine (lignée Rosa26-LSL-hNTN1 ou Tg-hNétrine-1). 77

Figure 22 : La perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte n'affecte pas le nombre de CSI par crypte *in vivo* 78

Figure 23 : Chez l'adulte, la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal induit une augmentation d'expression de marqueurs spécifiques des CSI et des cellules de Paneth. 79

Figure 24 : La Nétrine-1 de l'intestin grêle adulte ne semble pas sécrétée par les cellules de l'épithélium intestinal mais par les cellules de la *lamina propria* et de la musculeuse. 80

Figure 25 : *In vivo*, le gain de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte n'affecte pas le nombre de CSI par crypte. 83

Figure 26 : Effet de la surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte sur les profils d'expression géniques des compartiments souche et différencié. 84

Figure 27 : Ex vivo, la Nétrine-1 régule le compartiment souche intestinal et promeut la croissances des organoïdes. 85

Figure 28 : Profils d'expression de la Nétrine-1 et de ses récepteurs dans l'intestin grêle au cours du développement. 87

Figure 29 : La perte précoce de la Nétrine-1 dans l'embryon retarde l'ontogénèse de l'épithélium intestinal et l'émergence des villi. 90

Figure 30 : La surexpression précoce de Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire n'induit pas de phénotype évident à E16. Cette surexpression abaisse néanmoins le niveau protéique du récepteur Néogénine. 92

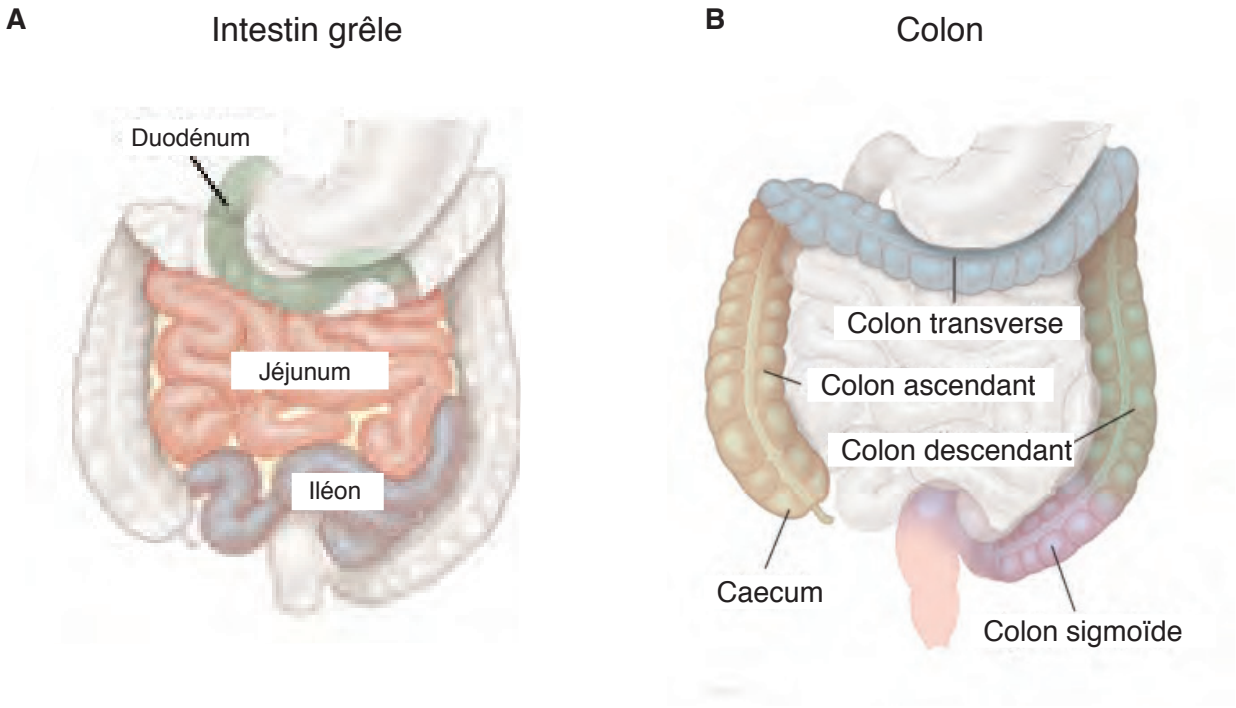
Figure 31 : La culture *ex vivo* d'intestins fœtaux au stade embryonnaire E16 génère une population mixte de sphéroïdes et d'organoïdes. 106

LISTE DES TABLES

Table 1 : Lignées murines de recombinases Cre utilisées 93

Table 2 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées en PCRq. 97

INTRODUCTION



<u>Figure 1 :</u> Anatomie de l'intestin humain.

Chez l'humain et plus généralement chez les mammifères l'intestin est divisé en deux parties : l'intestin grêle et le colon.

A. L'intestin grêle se compose de trois segments : le duodénum, le jéjunum, et l'liéon.

B. Le colon se compose également de plusieurs segments : le caecum puis des colons ascendant, transverse, descendant et sigmoïde.

CHAPITRE 1 :

L'EPITHELIUM DE L'INTESTIN GRELE EMBRYONNAIRE ET ADULTE

I. Organisation générale de l'intestin grêle adulte

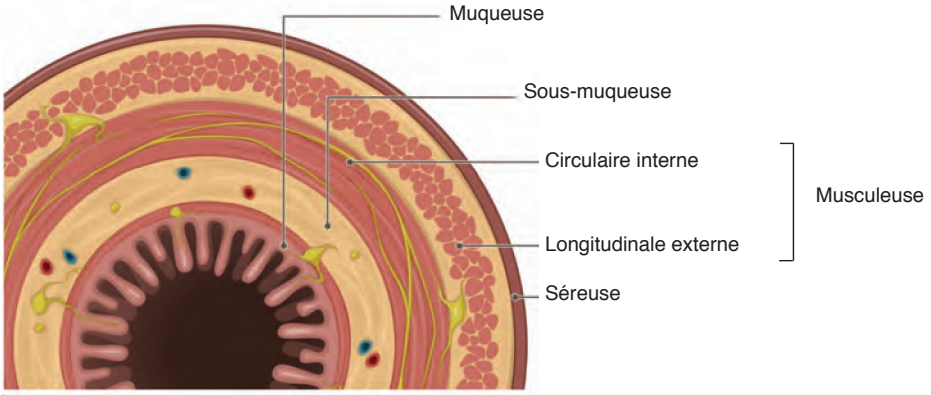
L'intestin constitue l'un des organes majeurs de l'appareil digestif. Responsable de l'apport énergétique vital de notre organisme, il se divise en deux parties distinctes : l'intestin grêle et le colon. L'intestin grêle, organisé selon l'axe antéro-postérieur en duodénum, jéjunum et iléon, est responsable de l'absorption massive des nutriments, de l'eau et des électrolytes contenus dans le chyme alimentaire. Le côlon, subdivisé en caecum, colon ascendant, colon transverse, colon descendant et colon sigmoïde est le site où s'effectue la dernière phase de la digestion qui consiste en la formation, et au stockage des déchets **(Figure 1)**. Outre ses fonctions digestives, l'intestin constitue également une puissante barrière protectrice contre les pathogènes et produits chimiques retrouvés dans la lumière intestinale.

Afin d'assurer l'ensemble de ses fonctions l'intestin grêle est organisé selon quatre feuillets tissulaires (tuniques) concentriques successifs dont la disposition est conservée du duodénum à l'iléon. De la couche la plus externe jusqu'à la couche la plus interne tapissant la lumière intestinale, se distinguent: la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse **(Figure 2)**.

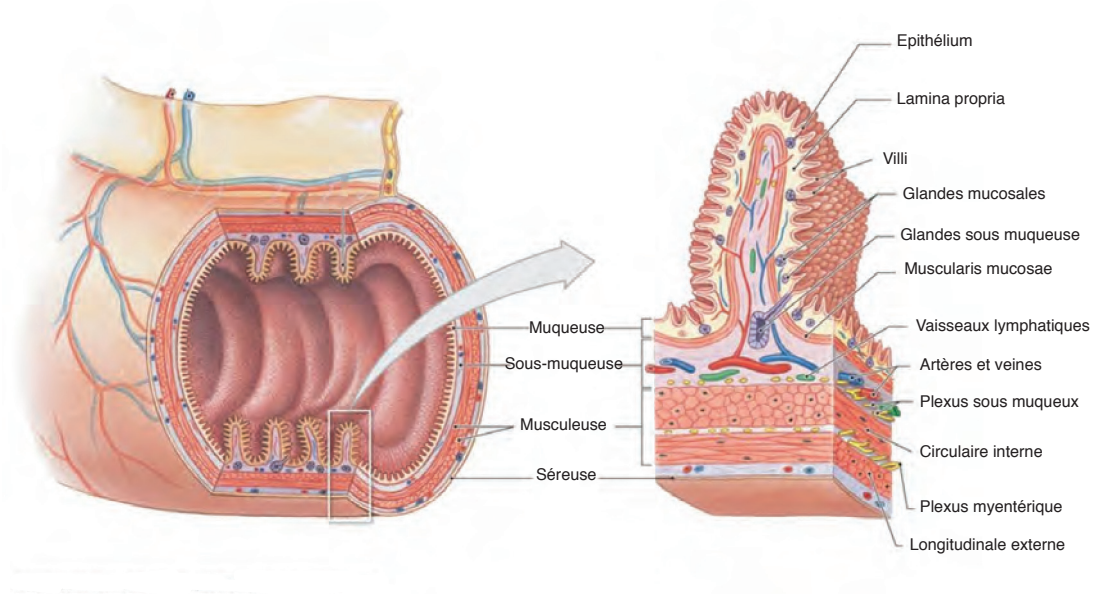
1. La séreuse

La séreuse ou enveloppe péritonéale est une fine tunique constituée de cellules mésothéliales et de tissu conjonctif. Responsable du maintien de l'ensemble de la structure intestinale elle confère néanmoins une certaine souplesse quant aux changements de diamètres engendrés par le passage du chyme. Cette tunique est également le point d'entrée et de sortie des systèmes nerveux entérique, sanguin et lymphatique qui drainent l'intestin.

A



B



<u>Figure 2</u> : Organisation structurelle de l'intestin grêle adulte.

L'intestin grêle se compose de quatre couches tissulaires (tuniques) successives concentriques.

A. Représentation schématique des quatre tuniques intestinales, en coupe transversale. De la couche tissulaire la plus externe à la couche tissulaire la plus interne : la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse

B. Représentation schématique détaillée de la paroi intestinale.
La séreuse est une enveloppe pariétale fine. La musculeuse se compose de deux couches musculaires lisses : la couche longitudinale externe et la couche circulaire interne. Le plexus myentérique qui constitue l'un des deux plexi du système nerveux entérique est situé entre ces deux couches musculaires. La sous muqueuse est un tissu conjonctif abritant les réseaux vasculaire et lymphatique. Le plexus sous muqueux, second plexus du système nerveux entérique est implanté dans cette tunique. Enfin, la muqueuse, en contact avec le lumen, se compose d'une fine couche musculaire : la *muscularis mucosae,* d'un tissu conjonctif : *la lamina propria* et d'un épithélium.

2. La musculeuse

Ce feuillet tissulaire, responsable des mouvements péristaltiques de l'intestin, est organisé selon deux couches de cellules musculaires lisses perpendiculaires l'une par rapport à l'autre : la couche longitudinale externe et la couche circulaire interne.
Entre ces deux couches musculaires se trouve l'un des deux plexi nerveux qui constituent le système nerveux entérique : le plexus myentérique, encore appelé plexus d'Auerbach.

3. La sous-muqueuse

Cette tunique est constituée de tissu conjonctif abritant un riche réseau vasculaire et lymphatique. Elle contient également le second plexus nerveux entérique appelé plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner.

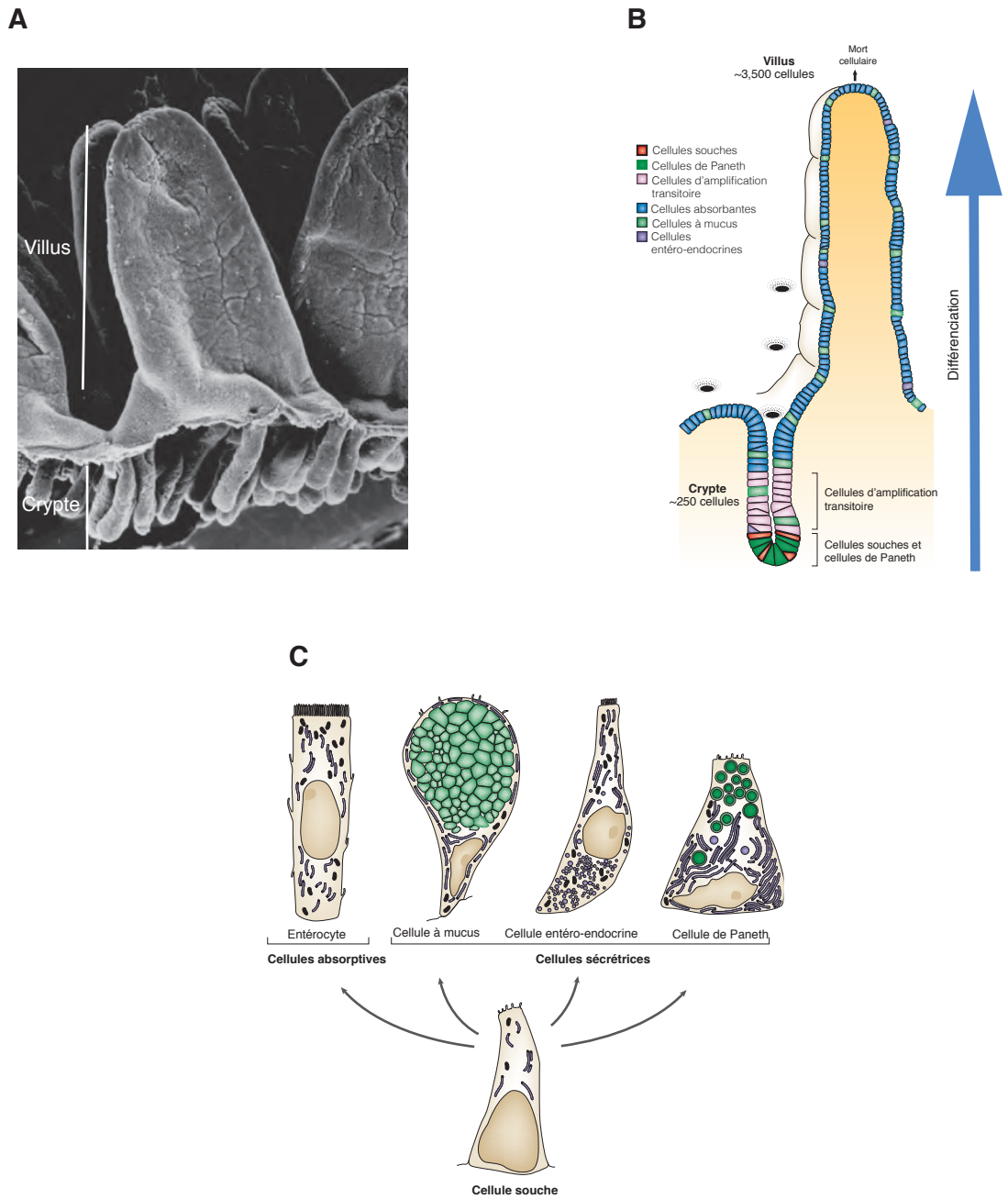
4. La muqueuse

Cette dernière structure hautement organisée est composée de trois couches distinctes successives : la *muscularis mucosae*, la *lamina propria* et l'épithélium.

- La *muscularis mucosae* ou musculaire muqueuse est une fine couche de cellules musculaires lisses qui sépare la sous-muqueuse de la *lamina propria*.

- La *lamina propria* ou chorion est un tissu conjonctif riche au sein duquel cohabitent notamment fibroblastes, myofibroblastes et cellules immunitaires. Ce tissu héberge également un important réseau de capillaires veineux et lymphatiques qui, accolé à l'épithélium permet le passage des nutriments, électrolytes de la lumière intestinale vers le reste de l'organisme.

- L'épithélium monostratifié en contact direct avec le lumen est une structure hautement organisée et complexe qui assure les fonctions d'absorption, de digestion mais également de sécrétion de l'intestin. Constamment exposé à des agressions, dues au passage du chyme provoquant des stress mécaniques et chimiques, l'épithélium intestinal doit également assurer le maintien de son intégrité et de son homéostasie. Les cellules épithéliales qui composent ce tissu sont ainsi renouvelées régulièrement et présentent pour la plupart une durée de vie limitée.



<u>Figure 3 :</u> Organisation de l'épithélium intestinal grêle adulte

A. L'épithélium intestinal adulte s'organise en cryptes, invaginations dans la *lamina propria* sous-jacente, et en villi, protrusions s'étirant dans la lumière intestinale. Image de l'épithélium intestinal adulte en microscopie électronique. Adapté de Barker, 2014.

B. Représentation schématique de l'organisation épithéliale cellulaire le long de l'axe crypte/villus. Localisées à la base des cryptes les CSI sont intercalées entre les cellules de Paneth. En se divisant elles génèrent des cellules d'amplification transitoire hautement prolifératives qui migrent en direction du villus et se différencient en cellules post-mitotiques sécrétrices ou absorptives. Au sommet du villus les cellules différenciées meurent et sont éliminées dans la lumière intestinale.

C. Représentation schématique des différents types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal. Le lignage sécréteur se compose des cellules caliciformes à mucus, des cellules entéro-endocrines ainsi que des cellules de Paneth. Le lignage absorptif est constitué des entérocytes. B et C adaptés de Crosnier *et al.*, 2006.

II. L'épithélium de l'intestin grêle : un tissu finement organisé

A. Organisation structurelle de l'épithélium de l'intestin grêle adulte

L'épithélium qui tapisse la lumière de l'intestin grêle est un épithélium unistratifié polarisé, organisé selon des unités cryptes/villi répétées. Les cryptes de Lieberkühn (ou cryptes intestinales) résultent d'invaginations de l'épithélium intestinal dans la *lamina propria.* Elles sont le siège d'une activité proliférative intense et présentent un nombre restreint de cellules différenciées. A l'inverse, les villi qui forment des protrusions s'étirant dans la lumière intestinale sont constitués de cellules différenciées. Ils constituent les unités fonctionnelles de cet épithélium **(Figure 3A)**.

L'épithélium intestinal est perpétuellement soumis à des stress mécaniques, chimiques ou biologiques résultants du passage du chyme alimentaire dans la lumière intestinale. Afin d'éviter l'accumulation d'anomalies génétiques et/ou épigénétiques les cellules épithéliales sont régulièrement remplacées. L'épithélium intestinal est ainsi entièrement renouvelé tous les 5 à 7 jours (Marshman et al., 2002). Ce processus qui veille au maintien de l'homéostasie intestinale est assuré par la présence de cellules souches intestinales (CSI) localisées à la base des cryptes. En se divisant celles-ci génèrent des progéniteurs hautement prolifératifs, connus sous le nom de cellules d'amplification transitoire (TA) qui, après avoir opéré 5 à 6 cycles de prolifération, migrent le long de l'axe crypte/villus et se différencient en l'un des deux grands lignages cellulaires constituant l'épithélium intestinal : le lignage sécréteur et le lignage absorptif (Heath, 1996). La différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire ont lieu lors du passage de la limite crypte/villus. A la fin de leur migration les cellules matures différenciées atteignent le sommet des villi où elles meurent et sont exfoliées dans la lumière intestinale **(Figure 3B)**. Le nombre de cellules produites par les cellules souches au niveau des cryptes doit donc contrebalancer le nombre de cellules éliminées au sommet des villi.

Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal (Figure 3C), pour revue (Noah et al., 2011) :

1. Les cellules souches intestinales (CSI)

Localisées au fond des cryptes intestinales (Leblond and Stevens, 1948), les CSI sont à la base du maintien homéostatique de l'épithélium intestinal. Multipotentes, elles génèrent de façon continue l'ensemble des différents types cellulaires qui constituent l'épithélium

intestinal. Chaque cellule épithéliale est ainsi issue d'une CSI. Ces cellules possèdent également une capacité d'auto-renouvellement permettant de maintenir leur propre existence. Nous verrons au cours du chapitre 2 que l'identification de cette population fut sujette à débats. Aujourd'hui elle est couramment identifiée par l'expression du marqueur Lgr5 notamment (Barker et al., 2007).

2. Les cellules d'amplification transitoire (TA)

Issues de la division des CSI, les cellules d'amplification transitoire sont des progéniteurs à haut potentiel proliératif. Se divisant toutes les 12 à 18 heures ces cellules réalisent 4 à 6 cycles de division avant de se différencier en cellules du lignage sécréteur ou absorptif (Potten, 1998). Leur rôle consiste à amplifier considérablement le nombre de cellules générées au niveau des cryptes. De part leur capacité proliératives les TA sont aisément visualisées *via* des marquages Ki67, Edu ou Brdu.

3. Les cellules sécrétrices

- Les cellules caliciformes à mucus

Les cellules caliciformes représentent 15% de l'épithélium intestinal grêle et constituent de ce fait le type cellulaire le plus représenté de la lignée sécrétrice. Ces cellules produisent et sécrètent un mucus visant à faciliter le transit du chyme, à limiter l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales et à protéger ces dernières des divers stress chimiques et enzymes gastriques et biliaires. Elles confèrent ainsi une première barrière protectrice aux cellules épithéliales contre les agressions extérieures. Les cellules caliciformes à mucus sont aisément identifiables car elles présentent de nombreuses et volumineuses vésicules de sécrétion qui leur donnent une forme évasée au pôle apical. De plus ces vésicules contiennent des mucopolyssacharides acides reconnus par le bleu Alcian. L'un des marqueurs principaux des cellules à mucus est la mucine intestinale Muc2.

- Les cellules entéro-endocrine

Ces cellules ne représentent qu'1% des cellules épithéliales. Petites et de forme allongée les cellules entéro-endocrines sont réparties de façon ponctuelle et individuelle tout au long de l'axe crypto-villositaire. A l'heure actuelle plus de seize sous types de cellules

entéro-endocrines ont été identifiés dans l'intestin de souris. Ceux ci se caractérisent par la nature des hormones qu'ils sécrètent (sérotonine, sécrétine, substance P, ...). Les cellules entéro-endocrines expriment dans la plupart des sous-types la Chromogranine A (ChgA) , utilisée de ce fait comme marqueur de ce type cellulaire.

- Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth représentent probablement le type cellulaire différencié le plus intriguant de l'épithélium intestinal. Contrairement aux autres cellules différenciées qui migrent vers le haut des villi, ces cellules migrent en direction de la base des cryptes pour s'intercaler entre les cellules souches. De plus, alors que les cellules différenciées qui composent les villi sont éliminées tous les 5 à 7 jours, les cellules de Paneth ont une durée de vie d'environ six semaines (van der Flier and Clevers, 2009). Observées tout au long de l'intestin grêle, elles sont néanmoins absentes du colon. Les cytoplasmes de ces cellules présentent au niveau apical de nombreuses et larges granules de sécrétion riches en protéines et peptides antimicrobiens. Le Lysozyme et les α-défensines en sont des exemples. Ils sont couramment utilisés comme marqueurs des cellules de Paneth. Ces molécules anti-microbiennes sont aujourd'hui reconnues comme des médiateurs clés des interactions hôtes-microbiote. Elles jouent un rôle essentiel dans l'équilibre entre la colonisation de l'intestin par le microbiote et la défense immunitaire contre les pathogènes.

4. Les cellules absorptives

Egalement appelées entérocytes ces cellules représentent le type cellulaire majoritaire de l'épithélium intestinal. Elles occupent ainsi 80 à 90% des cellules de cet épithélium. Très fortement polarisées, elles présentent à leur surface apicale des microvillosités qui composent une bordure en brosse. Cette dernière permet ainsi d'augmenter la surface apicale des entérocytes dont le rôle premier consiste à absorber les nutriments contenus dans la lumière intestinale puis à les exporter dans les circulations sanguine et lymphatique au niveau de leur pôle basal. Un marqueur des entérocytes couramment utilisé est la phosphatase alcaline intestinale (Alpi).

5. Les autres types cellulaires

Dans l'intestin grêle, plus particulièrement au niveau de l'iléon, existent des structures spécialisées dans la réponse immunitaire appelées plaques de Peyer. Ces plaques constituent des follicules lymphoides composés de lymphocytes B et T, de macrophages et de cellules dendritiques. Elles sont séparées du lumen par des cellules qui les surplombent : les cellules de M. Ces dernières présentent une forte activité d'endocytose qui leur permet de capturer les différents antigènes retrouvés dans la lumière intestinale et de les présenter aux cellules dendritiques. Par la suite, les cellules dendritiques activent les lymphocytes des plaques de Peyer qui régulent la réponse immunitaire.

Récemment un quatrième type cellulaire appartenant à la lignée sécrétrice a été mis en évidence : les cellules de Tuft (Gerbe et al., 2011). Réparties le long de l'épithélium, ces cellules qui représentent moins de 0,5% de la population épithéliale interviendraient dans la réponse immunitaire contre les vers (Gerbe et al., 2016).

L'organisation de l'épithélium intestinal en unités cryptes/villi est opérée pour la plupart des mammifères lors du développement embryonnaire. Chez l'homme par exemple l'épithélium intestinal acquière sa structure définitive au cours de la période gestationnelle. Il est ainsi pleinement fonctionnel dès la naissance. Toutefois chez certaines espèces, tels les rongeurs, qui présentent une période gestationnelle relativement courte, le développement de l'épithélium intestinal est initié aux stades embryonnaires et se poursuit pendant la période post-natale. Ce n'est que 3 semaines après la naissance, au moment du sevrage, que l'épithélium intestinal présente sa structure et sa physiologie adulte dite mature.

B. Ontogénèse de l'épithélium intestinal chez la souris

Au cours du développement précoce de l'embryon la gastrulation conduit à la mise en place d'un axe antéro-posterieur ainsi qu'à l'émergence des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) dont dérive l'ensemble des tissus qui constituent un organisme. L'épithélium intestinal dérive du feuillet le plus interne : l'endoderme, alors que la sous-muqueuse et la musculeuse sont issues du mésoderme. Le système nerveux entérique est quant à lui issu des crêtes neurales d'origine ectodermique.

Chez la souris, dont la gestation est de 21 jours, le tube digestif se ferme au jour embryonnaire 9 (E9). A ce stade, l'intestin apparaît sous forme d'un épithélium

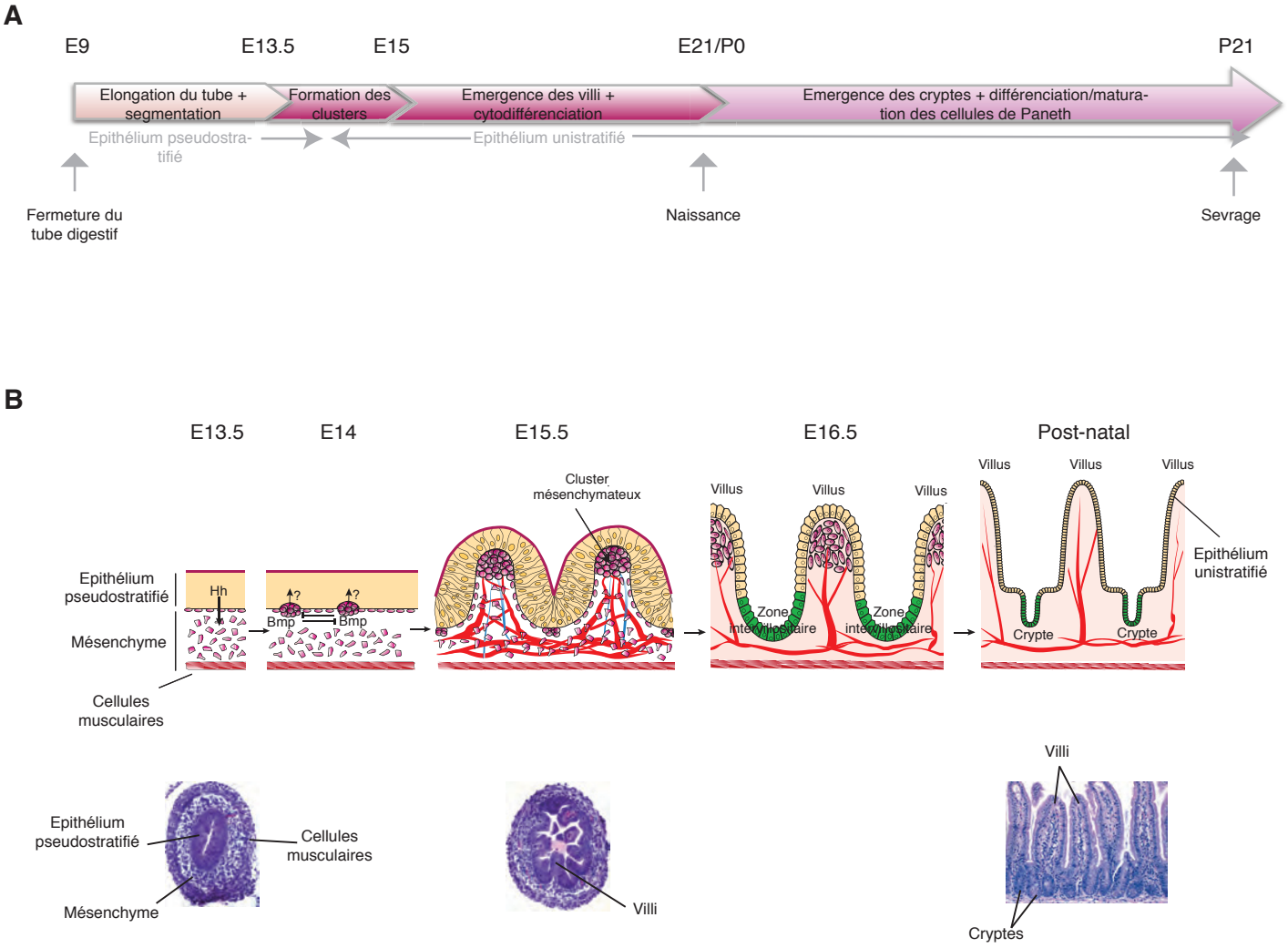


Figure 4 : Ontogénèse de l'épithélium intestinal grêle de souris

A. Chronologie des différentes phases de morphogénèse ayant lieu au cours du développement de l'épithélium intestinal grêle chez la souris.
Chez la souris l'épithélium intestinal grêle n'acquiert sa structure définitive qu'au moment du sevrage, i.e 3 semaines après la naissance. La phase d'émergence des villi à lieu lors de la période gestationnelle, du stade embryonnaire E15 au stade embryonnaire E18. Elle débute par la formation de clusters mésenchymateux. La phase d'émergence des cryptes se déroule durant la période post-natale d'allaitement. Elle est initiée dès la naissance et se termine environ au moment du sevrage.

B. A E13.5 l'épithélium intestinal est pseudostratifié, plat et épais. Les cellules épithéliales qui le constituent sont indifférenciées et prolifératives. Elles sécrètent de façon paracrine les ligands Hedgehog (Shh et Ihh) et PdgfA (non représenté) qui sont perçus par les cellules mésenchymateuses sous-jacentes. A E14 l'activation de la signalisation Hedgehog (Hh) et Pdgf au sein des cellules mésenchymateuses exprimant les récepteurs Ptc (Patched) et Pdgfrα conduit à l'agrégation de celles-ci sous forme de clusters denses . Ces clusters, qui expriment en réponse à leur formation des molécules Bmp, sont les points d'émergence des futurs villi. A E15.5 les premiers villi émergent et l'épithélium devient unistratifié et progressivement polarisé. A E16.5 l'épithélium est organisé selon (1) des zones non prolifératives au sein desquelles les cellules sont soumises à un processus de cytodifférenciation : les villi et (2) des zones prolifératives constituées de cellules indiffèenciées : les zones inter-villositaires reliant chaque villus aux villi voisins. A la naissance l'épithélium intestinal est dépourvu de crypte. La formation de ces dernières débute dans les jours suivant la naissance et se termine environ 3 semaines après, au moment du sevrage. Adapté de Walton et *al.*, 2016 et de Crosnier et *al.*, 2006.

pseudostratifié uniforme entouré par une structure mésodermique contenant majoritairement des cellules musculaires lisses et des fibroblastes: le mésenchyme (Sbarbati, 1982), (Beck et al., 1999), **(Figure 4)**. Cette organisation est observée jusqu'au stade E13.5, stade à partir duquel commence une importante période de morphogénèse. Cette période est subdivisée en deux grandes phases : la phase d'émergence des villi : la villogénèse, suivie de la phase d'émergence des cryptes : la cryptogénèse **(Figure 4A)**.

1. Emergence des villi

pour revues (Gordon and Hermiston, 1994), (McLin et al., 2009), (Spence et al., 2011), (Chin et al., 2017).

La formation des villi a lieu chez la souris pendant la période embryonnaire. Ce processus, qui débute au stade E14 et qui perdure jusqu'au stade E18, conduit au réarrangement de l'épithélium intestinal primitif pseudostratifié, plat et épais en un épithélium monostratifié cylindrique présentant des extensions dans la lumière intestinale : les villi (Sbarbati, 1982), (Lacroix et al., 1984).

La formation des villi résulte d'une intime communication entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent qui fait intervenir les voies de signalisations Hh (Hedgehog), Pdgf (Platelet Derived Growth Factor) et Bmp (Bone Morphogenetic Protein) (Madison et al., 2005), (Walton et al., 2012), (Karlsson et al., 2000). La sécrétion des ligands Hh (Sonic et Indian) et Pdgf-A par les cellules de l'épithélium pseudostratifié conduit à l'agrégation de cellules mésenchymateuses exprimant à leur surface les récepteurs Ptc (Patched) et Pdgfrα. Ces clusters cellulaires denses qui forment des « dômes » régulièrement disposés à la base de l'épithélium sont les points d'émergence des villi **(Figure 4B)**. Leur formation constitue un prérequis absolu à celle des villi. En effet, la surexpression fœtale de Hhip, inhibiteur global de la voie Hh, dans les cellules de l'endoderme intestinal abolie la formation des clusters mésenchymateux ainsi que celle des villi (Madison et al., 2005). De la même façon, le traitement *ex vivo* de culture d'explants intestinaux avec différents inhibiteurs de la voie Hh altère la formation des clusters et l'émergence des villi (Walton et al., 2012). A l'inverse par contre, la sur-activation de la voie Hh induite par un agoniste conduit à la formation de clusters plus larges puis de villi plus larges (Walton et al., 2012). Chez la souris la perte d'expression du ligand Pdgf-A ou de son récepteur Pdgfrα perturbe également la morphogénèse des villi, réduisant le nombre de clusters formés et par conséquent le nombre de villi (Karlsson et al., 2000). C'est donc par la formation de clusters mésenchymateux que débute le processus de villogénèse. Chez la souris ceux-ci sont observés dès le stade

embryonnaire E14.5 dans le duodénum. Leur apparition suit ensuite une vague proximo-distale du duodénum à l'iléon en à peine 36h (Walton et al., 2012) (**Figure 4B**).

Les clusters nouvellement formés expriment de multiples molécules de signalisation Bmp telles que Bmp 2, 4 et 5. Celles-ci sont notamment perçues par les cellules épithéliales qui expriment à leur surface le récepteur Bmpr1A. Cette signalisation Bmp est primordiale à la disposition régulière des clusters mésenchymateux ainsi qu'à la morphologie des villi émergents. La simple modulation de cette voie, tant par une surexpression de ligand que par une exposition à des inhibiteurs, suffit à affecter la disposition et la morphologie des clusters, et par conséquent celles des villi (Walton et al., 2015).

De E15.5 à E18, les villi formés amorcent une phase de croissance. Au cours de celle-ci l'épithélium intestinal jusque là uniformément prolifératif est réorganisé. Dès le stade E17 la prolifération épithéliale est restreinte à la base des villi, au niveau d'une zone connectant chaque villus à ses voisins: la zone intervillositaire (Bell et al., 2013), **(Figure 4B)**. Les cellules qui constituent les villi opèrent un arrêt du cycle cellulaire et entrent dans un processus de cytodifférenciation au cours duquel elles se différencient en entérocytes, en cellules entéro-endocrines ainsi qu'en cellules caliciformes à mucus. Contrairement aux autres types cellulaires, les cellules de Paneth ne sont pas produites pendant cette phase embryonnaire de cytodifférenciation. Leur émergence coïncide avec celle des cryptes intestinales et a donc lieu au cours de la période post-natale.

Les mécanismes qui régulent la cytodifférenciation et la prolifération des progéniteurs intestinaux prénataux sont contrôlés par les signalisations Wnt et Notch notamment. Ces voies de signalisations qui jouent également un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale adulte seront détaillées dans le paragraphe IV du chapitre 2.

A la naissance l'épithélium intestinal des nouveau-nés est dépourvu de crypte. Il se présente sous forme de villi contenant des cellules différenciées capables d'assurer les fonctions digestives des premiers jours après la naissance et de zones inter-villositaires proliferatives au sein desquelles résident des cellules présentant un caractère souche.

2. Emergence des cryptes

La formation des cryptes de l'épithélium intestinal est initiée immédiatement après la naissance par le déplacement des zones de connections villus/zone intervillositaire vers le haut. Ce déplacement, qui résulte d'un mouvement des cellules du mésenchyme, conduit les zones intervillositaires proliférative à adopter une structure en forme de « poche » appelée crypte. Chez la souris, les premières cryptes sont observées dès le quatrième jour post-natal P4 (Calvert and Pothier, 1990) (**Figure 4B**). A P14, le nombre de cryptes intestinales est considérablement augmenté par un processus de fission au cours duquel chaque crypte est divisée longitudinalement en deux cryptes « sœurs » (Clarke, 1972), (St. Clair and Osborne, 1985), (Cheng and Bjerknes, 1985).

Aujourd'hui les mécanismes et voies de signalisation qui contrôlent la cryptogénèse sont encore très mal connus. Les signalisations Hedgehog et Bmp semblent néanmoins jouer un rôle important dans ce processus puisque comme nous l'avons abordé, elles sont indispensables à l'organisation prénatale de l'épithélium en villi et zones intervillositaires (zones d'où émergent les cryptes). De plus la sur-expression de l'inhibiteur des Bmp, Noggin, dans l'épithélium intestinal embryonnaire conduit à la formation de cryptes ectopiques, perpendiculaires à l'axe crypte/villus (Haramis et al., 2004).

De façon intéressante, l'émergence des cryptes coïncide chez la souris avec la différenciation des cellules de Paneth. A P7 les premières cellules de Paneth peuvent ainsi être observées dans l'intestin grêle. Cependant celles-ci ne sont encore pas complètement matures puisque ne présentant pas l'ensemble des enzymes qui les caractérisent. A P14, de façon concomitante à l'augmentation du nombre de crypte par le processus de fission, le nombre de cellules de Paneth est considérablement augmenté. Enfin à P21-P28, lors du sevrage, les cellules de Paneth ont accomplies leur maturation et sont semblables aux cellules de Paneth des cryptes adultes (Bry et al., 1994).

Chez la souris, la structure et la physiologie définitives de l'épithélium intestinal ne sont donc acquises qu'au moment du sevrage, soit trois semaines après la naissance. Composé de cryptes et de villi l'épithélium intestinal est alors prêt à recevoir de la nourriture solide et à assurer l'ensemble de ses fonctions digestives et protectrices.

Le renouvellement permanent de l'épithélium intestinal ainsi que le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des cryptes et villi qui le constituent, sont assurés par la présence de CSI. Localisées à la base des cryptes, ces cellules requièrent un environnement très finement régulé au sein duquel persiste un équilibre entre les signaux contrôlant leur différenciation et ceux contrôlant leur auto-renouvellement. Nous verrons au cours du paragraphe IV du chapitre 2 quels sont ces signaux et comment ceux-ci sont régulés au sein des cryptes.

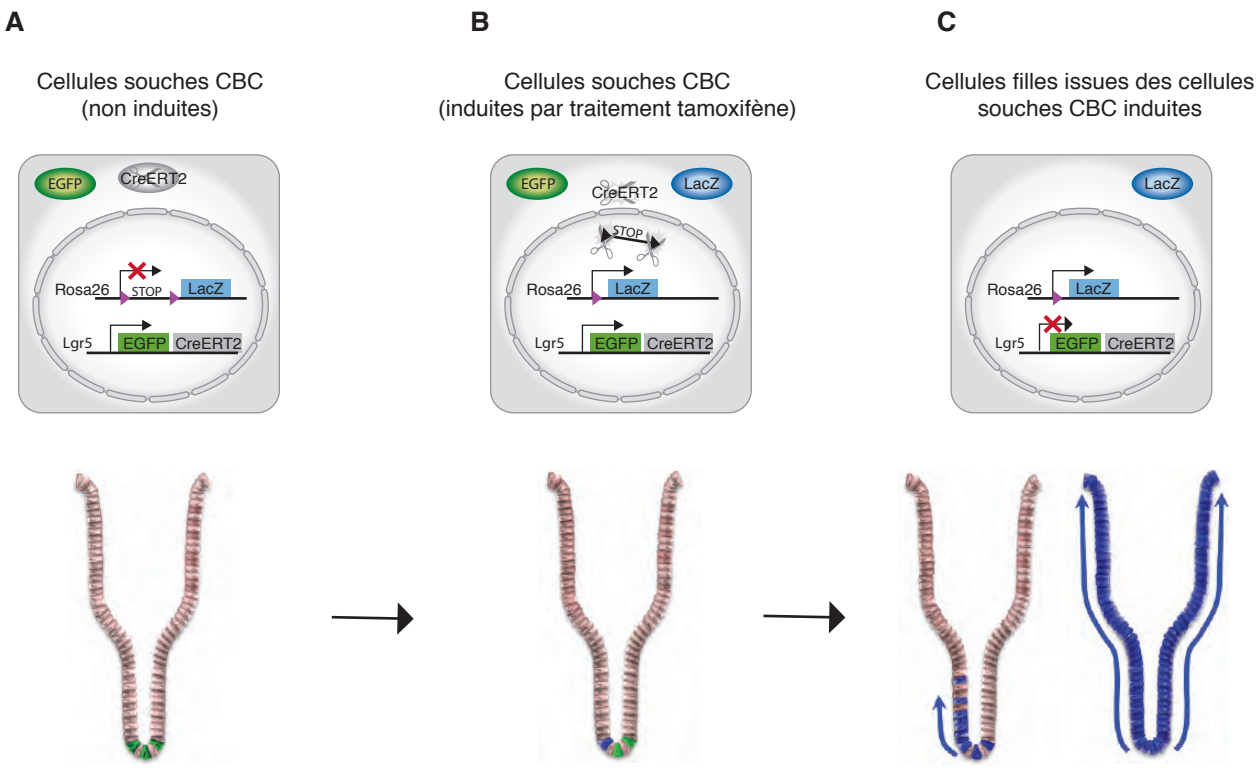
CHAPITRE 2 :

LES CELLULES SOUCHES INTESTINALES ADULTES ET LEUR NICHE

I. Identification des cellules souches intestinales adultes

Les cellules souches d'un tissu adulte se définissent par (1) leur multipotence, c'est à dire leur capacité à générer l'ensemble des types cellulaires constituant le tissu auquel elles appartiennent, ainsi que par (2) leur capacité d'auto-renouvellement. Pour mettre en évidence ces deux caractéristiques, les populations souches potentielles peuvent être soumises à deux stratégies expérimentales distinctes. La première, couramment appelée « lineage tracing » en anglais, consiste à suivre la descendance cellulaire d'une cellule unique. Elle permet ainsi de vérifier la multipotence de la cellule souche putative et de confirmer si l'ensemble des cellules du tissu étudié est effectivement issu de cette cellule unique. La seconde technique repose sur l'isolement de la population souche candidate, selon des marqueurs moléculaires qui lui sont spécifiques, afin de la mettre en culture ou de la greffer à des animaux receveurs. Il s'agit ici de tester la capacité d'auto-renouvellement des cellules isolées mais également leur capacité à se différencier en différents types cellulaires.

La localisation précise des CSI au sein des cryptes ainsi que l'identification des marqueurs moléculaires qui leur sont spécifiques placent ces cellules au cœur de débats scientifiques depuis plus de 50 ans. En effet, alors que Potten et *al.* proposaient que les CSI soient localisées en position « +4 » à partir de la base de la crypte, Cheng et Leblond proposaient au même moment que celles ci ne soient autres que les cellules localisées directement à la base des cryptes, intercalées entre les cellules de Paneth et jusque là appelées CBC (Crypt Base Columnar) (Potten et al., 1974), (Potten, 1977), (Cheng and Leblond, 1974a), (Cheng and Leblond, 1974b). Les arguments en faveur de l'une ou l'autre population reposaient à cette époque essentiellement sur les statuts prolifératifs de celles-ci ainsi que sur leur capacité à transmettre des mutations ponctuelles ou marquages radioactifs



<u>Figure 5 :</u> Expérience de « lineage tracing » au sein de l'épithélium intestinal grêle à partir du modèle murin Lgr5-EGFP-CreERT2 ; Rosa26-lox-stop-lox-LacZ.

A. Les cellules souches CBC Lgr5⁺ expriment le rapporteur EGFP ainsi que la CreERT2 sous la dépendance du promoteur Lgr5. En absence d'induction tamoxifène la CreERT2 est inactive.

B. L'activation de la CreERT2 via une injection de tamoxifène, induit au sein des cellules souches Lgr5⁺ une recombinaison Cre/Lox irréversible. Celle-ci conduit à l'expression du traceur LacZ, placée sous la dépendance du locus ubiquitaire Rosa26.

C. Les cellules souches multipotentes Lgr5⁺ génèrent l'ensemble des différents types cellulaires constituant l'épithélium intestinal. La recombinaison Cre/Lox irréversible initiée au sein de ces cellules est donc transmise aux cellules filles. Après quelques jours l'ensemble des cellules épithéliales exprime le gène LacZ. Le locus Lgr5 n'étant actif que dans les cellules souches CBC, les cellules filles n'expriment ni le rapporteur EGFP, ni la CreERT2.
Adapté de Snippert and Clevers, 2011 et de Barker et *al.*, 2013.

à l'ensemble des cellules de l'épithélium. Aujourd'hui la théorie prévalente suggère l'existence de deux populations de CSI : la première, représentée par les cellules CBC, serait responsable du maintien homéostatique de l'épithélium intestinal dans des conditions physiologiques saines, alors que la seconde, représentée par les cellules « +4 » serait capable de régénérer les cellules CBC lors de dommages occasionnés par divers stress chimiques, physiques ou biologiques. Cette seconde population de CSI constituerait donc un « réservoir » de cellules souches sollicitées dans des conditions pathologiques.

A. Les cellules souches intestinales CBC

Localisées entre les cellules de Paneth, les cellules CBC sont des cellules indifférenciées, hautement prolifératives (cyclant toutes les 21 heures environ), et relativement sensibles aux irradiations. (Cheng and Leblond, 1974a), (Bjerknes and Cheng, 1981a), (Bjerknes and Cheng, 1981b), (Bjerknes and Cheng, 1981c). La découverte en 2007, du récepteur membranaire Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5), (Barker et al., 2007) comme marqueur spécifique de ces cellules, fut à l'origine de nombreuses études attestant du « caractère souche » de cette population.

Afin de tester le « potentiel souche » des cellules CBC Lgr5 positives (Lgr5$^+$) l'équipe de Hans Clevers généra un modèle murin Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2. Cet outil qui permet de visualiser la population CBC et de l'isoler par cytométrie en flux, permet également d'induire une recombinaison Cre/Lox au sein ces mêmes cellules. Cette recombinaison irréversible est ensuite transmise à la descendance des cellules CBC. Le croisement de ce modèle murin avec le modèle rapporteur Rosa26-lox-stop-lox-LacZ permit de mettre en exergue la capacité des cellules CBC Lgr5$^+$ à générer l'ensemble des différents types cellulaires de l'épithélium intestinal (Barker et al., 2007). En effet, l'induction de la recombinaison Cre/Lox au sein d'une cellule unique Lgr5$^+$, *via* l'administration d'une faible dose de tamoxifène, suffit à observer l'expression progressive du rapporteur β-Galactosidase le long de l'axe crypte/villus. Après une courte période, l'expression de celui-ci fut rapportée dans l'ensemble des cellules de l'épithélium, de la base des cryptes au sommet des villi. **(Figure 5)**.

Ex vivo, dans des conditions mimant celles de la crypte, les cellules CBC Lgr5$^+$ isolées génèrent des structures épithéliales 3D (des organoïdes[1]) présentant l'ensemble des types cellulaires de l'épithélium intestinal. Ces cultures peuvent être maintenues quasiment

[1] Les organoïdes intestinaux également appelés entéroïdes ou mini intestins sont des cultures 3D de CSI permettant de modéliser *ex vivo* la plupart des caractéristiques anatomiques et physiologiques de l'épithélium intestinal *in vivo*.

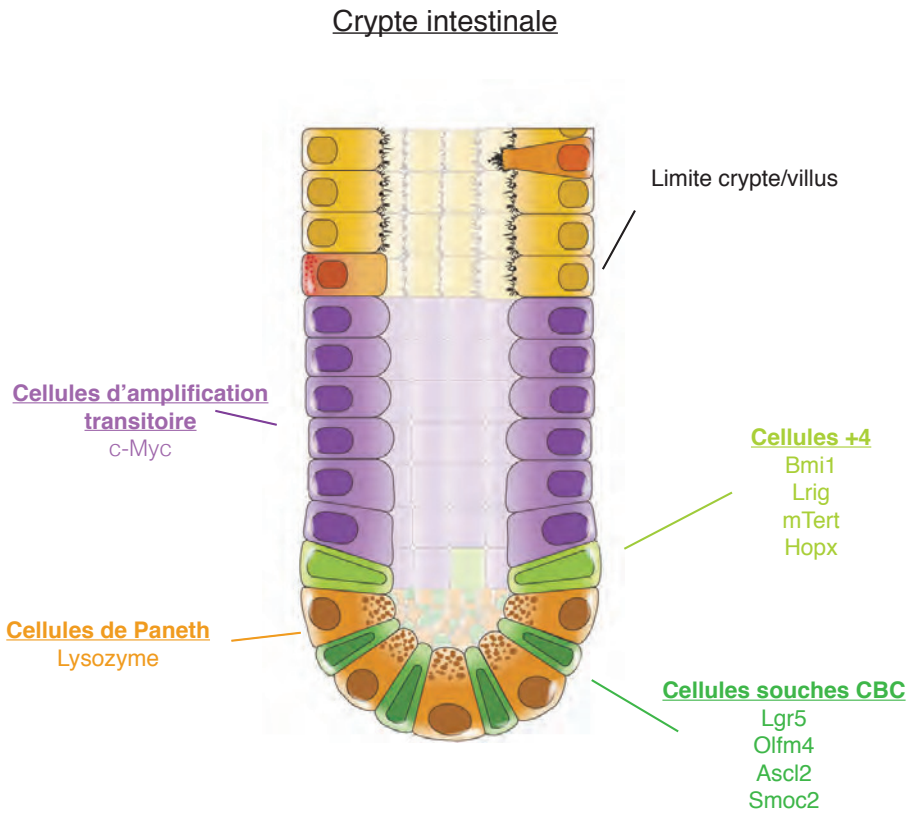


Figure 6 : Organisation des populations de cellules souches intestinales au sein des cryptes en conditions physiologiques.

Les cellules souches intestinales CBC et « +4 » sont hébergées au niveau des cryptes de l'épithélium intestinal grêle. Les cellules souches CBC, localisées à la base des crypte sont intercalées entres les cellules de Paneth. Elles constituent les CSI responsables du maintien de l'homéostasie épithéliale en conditions physiologies et expriment les marqueurs Lgr5, Olfm4, Ascl2 et Smoc2. Les cellules souches « +4 » de « réserve » sont localisées juste en dessous du compartiment d'amplification transitoire. Ces cellules expriment de façon non exclusive les marqueurs Bmi-1, Lrig-1, mTert, et Hopx.
Adapté de Carulli et *al.*, 2014

indéfiniment, témoignant ainsi de la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation de celles-ci (Sato et al., 2009). Ces expériences apportèrent ainsi les preuves que les cellules CBC Lgr5$^+$ constituent une population de CSI. Dans l'intestin grêle adulte chaque crypte compte 14 ±2 cellules Lgr5$^+$ (Barker et al., 2007), (Clevers, 2013).

Les analyses transcriptomiques des cellules Lgr5$^+$ de l'épithélium intestinal qui firent suite à l'authentification de ce marqueur, menèrent à l'identification d'une « signature souche intestinale » (van der Flier et al., 2009a), (Muñoz et al., 2012). Parmi les centaines de gènes qui composent cette signature, certains furent identifiés comme exclusifs aux CSI Lgr5$^+$ et nécessaires au maintien du leur caractère souche. Ils constituent aujourd'hui des marqueurs cellulaires reconnus des CSI Lgr5$^+$. Parmi ceux-ci se trouvent notamment les gènes *Ascl2 (Ashaete-scute complex homolog)* (van der Flier et al., 2009a; Muñoz et al., 2012), *Olfm4 (Olfactomedin 4)* (van der Flier et al., 2009b; Muñoz et al., 2012), *Smoc-2 (Secreted modulator calcium binding matricellular protein-2)* (Muñoz et al., 2012), les ubiquitines ligases E3 Rnf43 et Znrf3 (Koo et al., 2012) et *Tnfrsf-19* (Fafilek et al., 2013).
Notons que la signature souche intestinale est fortement enrichie en gènes cibles de la voie Wnt, voie de signalisation indispensable au maintien des CSI que nous aborderons dans le paragraphe IV.

Aujourd'hui les CSI dites « vraies », *i.e* qui veillent à l'homéostasie intestinale dans des conditions physiologiques saines, sont donc représentées par les cellules CBC à la base des cryptes et identifiables *via* le marqueur Lgr5 notamment **(Figure 6)**.

La délétion embryonnaire du gène *Lgr5* entraîne une létalité néonatale des individus *Lgr5*$^{-/-}$, caractérisée par une dilatation du tractus gastro-intestinal ainsi que par des malformations de la langue et des joues (Morita et al., 2004). A l'inverse, de façon très intéressante, l'ablation à l'âge adulte des cellules exprimant le gène *Lgr5, via* la génération d'un modèle murin exprimant le récepteur de la toxine diphtérique (DTR) sous la dépendance du promoteur Lgr5, ne perturbe aucunement l'architecture et l'homéostasie intestinale (Tian et al., 2011). Cette constatation conduit à envisager l'existence d'un mécanisme de compensation de la perte des CSI Lgr5$^+$. L'analyse approfondie de ce modèle murin révéla que l'ablation des cellules CBC Lgr5$^+$ était suivie par une expansion du compartiment cellulaire « +4 », alors capable de générer l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal. De plus, immédiatement après l'arrêt des injections de toxine diphtérique, la population de cellules CBC Lgr5$^+$ fut à nouveau observée à la base des cryptes. Des expériences de « lineage tracing » révélèrent que celles-ci étaient issues de la population cellulaire « +4 » (Tian et al., 2011). En absence de CSI Lgr5$^+$ la population de cellules localisée en position « + 4 » de la crypte pourrait ainsi servir de CSI alternatives et préserver l'homéostasie intestinale.

B. Les cellules intestinales « + 4 », des cellules souches de secours ?

En 1974, Potten et *al.* rapportèrent l'existence de cellules capables de retenir les marqueurs d'ADN (DNA label retaining cells, LRCs) en position « +4 » des cryptes, juste au dessus des cellules de Paneth (Potten et al., 1974). Cette caractéristique, qui révèle l'état quiescent d'une cellule, est très couramment observée au sein des populations souches de divers tissus adultes. En effet il est proposé que ces cellules n'entrent en division cellulaire que lors de processus de régénération tissulaire. Les cellules « +4 » des cryptes sont également sensibles aux radiations (Potten, 1977), (Potten et al., 1978). Cette seconde propriété présentée par de nombreuses cellules souches permettrait à celles-ci de se protéger de l'accumulation de mutations génétiques. Les cellules « +4 » des cryptes présentant des caractéristiques communes aux populations de cellules souches adultes furent proposées comme CSI.

Le premier marqueur historiquement proposé comme marqueur spécifique de cette population « +4 » fut la protéine Bmi1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) (Sangiorgi and Capecchi, 2008). Au cours de leur étude Sangiorgi et Capecchi démontrèrent la multipotence des cellules « +4 » Bmi1$^+$ grâce à une expérience de « lineage tracing ». Néanmoins quelques années plus tard, l'analyse par hybridation *in situ* de ce marqueur au sein de cryptes intestinales, révéla une expression hétérogène de Bmi1 dans l'ensemble des cellules de la crypte (Itzkovitz et al., 2011). Ceci fut confirmé par une seconde expérience de « lineage tracing » au cours de laquelle il fut montré que les cellules initiatrices du marquage n'étaient pas restreintes à la position « +4 » mais bien présentes dans toutes les cellules de la crypte dont les cellules CBC Lgr5$^+$ (Muñoz et al., 2012). D'autres marqueurs tels que *mTert* (*Telomerase reverse transcriptase*) (Montgomery et al., 2011), *Hopx* (*HOP homeobox*) (Takeda et al., 2011) , *Msi-1* (*Musashi-1*) (Potten et al., 2003), *Lrig-1* (*Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1*) (Powell et al., 2012) furent également proposés comme marqueurs des cellules « +4 » **(Figure 6)**. Malheureusement aucun de ceux-ci ne semble réellement spécifique de cette population. Leur expression a en effet pu être observée au sein d'autres cellules de la crypte, dont les cellules CBC Lgr5$^+$, comme en témoigne la signature de celles-ci (Muñoz et al., 2012). Aujourd'hui l'identification de marqueurs spécifiques des cellules « + 4 » reste au cœur de nombreuses recherches.

Les propriétés présentées par les cellules « + 4 » : la rétention des marqueurs d'ADN, une grande sensibilité aux radiations, un statut non différencié ainsi qu'une capacité à générer l'ensemble des types cellulaires de l'épithélium en absence de cellule Lgr5$^+$,

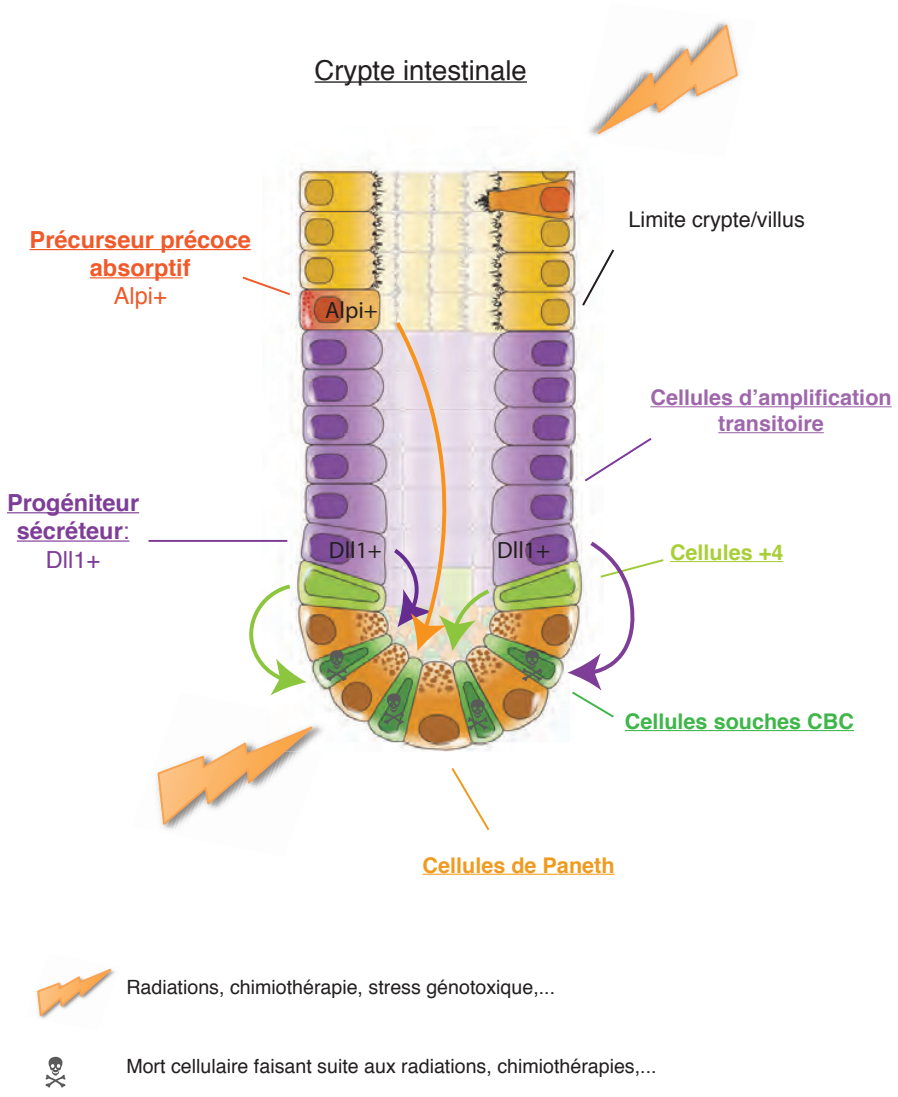


Figure 7 : Plasticité cellulaire au sein des cryptes intestinales après ablation de la population souche CBC Lgr5⁺.

L'exposition à des radiations, à des agents chimiothérapeutiques, ou à des agents génotoxiques par exemple peut conduire à la perte des cellules souches intestinales CBC Lgr5⁺. Dans ces conditions, certaines cellules de la crypte, non affectées par ces dommages, peuvent contribuer à la régénération tissulaire. Les cellules souches intestinales de réserve « +4 » sortent de leur quiescence afin de redonner des cellules souches CBC Lgr5⁺. Certains progéniteurs sécréteurs Dll1⁺ ainsi que certains précurseurs préccoces absorptifs Alpi⁺ semblent également pouvoir participer au ré-établissement de la population souche intestinale CBC Lgr5⁺, *via* un processus de dédifférenciation.
Adapté de Carulli et *al.*, 2014

confèrent à celles-ci un caractère proche d'un caractère souche. Aujourd'hui il est ainsi proposé que les cryptes de l'épithélium intestinal hébergent deux populations de cellules souches distinctes : la population CBC Lgr5$^+$ (se divisant un fois par jour et responsable de l'auto-renouvellement quotidien du tissu), la population « +4 » de réserve (quiescente en conditions physiologiques saines et responsable de la régénération tissulaire et du maintien homéostatique de l'épithélium intestinal en réponse à des dommages générés par des irradiations ou des traitements médicamenteux par exemple) (Li and Clevers, 2010), (Tian et al., 2011).

II. Plasticité cellulaire du compartiment souche intestinal

Afin de survivre aux différentes agressions environnementales telles qu'aux dommages cytotoxiques, aux dommages de l'ADN, aux radiations, aux traitements de chimiothérapie ou encore aux résections chirurgicales auxquels il peut être soumis, l'épithélium intestinal présente une capacité de régénération extrêmement développée et rapide. Celle-ci lui permet de restaurer son homéostasie au plus vite et d'assurer ses fonctions. Cette capacité de régénération repose sur l'existence d'une importante plasticité cellulaire au sein de la crypte, qui se définie par la capacité de certaines cellules à adopter les caractéristiques fonctionnelles et structurelles des cellules CSI Lgr5$^+$.

Comme nous venons de le voir les cellules « +4 » semblent pouvoir pallier à la perte des cellules souches Lgr5$^+$ *via* leur capacité à générer l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal dont les cellules Lgr5$^+$ elles mêmes (Tian et al., 2011). Outre ces cellules souches « de réserve » de plus en plus d'études tendent à montrer la capacité de certains progéniteurs à pouvoir se dédifférencier en CSI Lgr5$^+$ fonctionnelles à la suite de stress ayant occasionnés des dommages de cette population.

Ainsi, en 2012 Van Es et *al.* montrèrent que les cellules Dll1$^+$ de la crypte, progéniteurs précoces du lignage sécréteur localisés en position +5, sont capables de se dédifférencier en CSI Lgr5$^+$ suite à la délétion de celles-ci par irradiations (van Es et al., 2012). Plus récemment, une seconde étude révéla que cette capacité de dédifférenciation en CSI Lgr5$^+$ était également partagée par les précurseurs du lignage absorptif Alpi$^+$, localisés en positions +6 /+7 dans la crypte (Tetteh et al., 2016). Le compartiment crypte de l'épithélium intestinal apparaît donc comme un compartiment complexe, garant de l'homéostasie intestinale **(Figure 7)**.

Comme nous l'avons vu, il est aujourd'hui admis, que dans les conditions physiologiques, la population de cellules souches CBC Lgr5$^+$ constitue la population de CSI. Dans la suite de ce manuscrit le terme de CSI désignera donc les cellules CBC Lgr5$^+$, Smoc2$^+$, Ascl2$^+$, … localisées à la base des cryptes intestinales, entre les cellules de Paneth.

III. Origine des cellules souches intestinales adultes Lgr5$^+$

Depuis l'identification du marqueur Lgr5 comme marqueur spécifique des CSI, plusieurs équipes se sont attachées à déterminer le stade de développement auquel apparaissent ces cellules. Les données publiées à ce sujet sont assez contradictoires. En effet, certaines études rapportent une absence d'expression du marqueur Lgr5 aux stades embryonnaires. L'expression de ce dernier serait ainsi concomitante à la formation des cryptes, et ne serait détectable qu'après la naissance, à partir du stade post-natal P4 chez la souris (Dehmer et al., 2011), (Kim et al., 2012). Ces cellules ne seraient ainsi pas nécessaires à la génération des différents types cellulaires constituant les villi prénataux, suggérant l'existence de potentiels précurseurs fœtaux aux CSI adultes.
A l'inverse, d'autres études plus récentes rapportent l'expression du marqueur Lgr5 dès le stade embryonnaire E12.5 (Shyer et al., 2015), E13.5 (Nigmatullina et al., 2017) ou encore E14 (Mustata et al., 2013), c'est à dire juste avant la formation des villi. De plus ces études révèlent une expression croissante du marqueur Lgr5 au cours du développement embryonnaire, résultant de l'expansion de la population cellulaire exprimant celui-ci. Au cours de l'étude réalisée en 2013 Mustata et *al.* montrèrent également la capacité des cellules embryonnaires Lgr5$^+$ à former *ex vivo* des organoïdes semblables à ceux générés par les CSI Lgr5$^+$ adultes. Il fut ainsi suggéré que les cellules embryonnaires Lgr5$^+$ puissent être les précurseurs des CSI Lgr5$^+$ post-natales. Cette hypothèse fut confirmée *via* des expériences de « lineage tracing » basée sur le modèle murin rapporteur Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 ; Rosa26-lox-stop-lox-dtTomato (Shyer et al., 2015), (Nigmatullina et al., 2017).
Outre les cellules embryonnaires Lgr5$^+$, Mustata et *al.* révélèrent également l'existence d'une population de cellules souches intestinales fœtales (population de cellules multipotentes capables de s'auto-renouveler). Distincte des cellules Lgr5$^+$ cette population se caractérise par l'expression de marqueurs spécifiques tels que Cnx43 (Connexin 43) et Trop2, et disparaît dès la naissance. Chez la souris l'épithélium intestinal fœtal serait donc généré préférentiellement à partir des CSI fœtales Cnx43$^+$ alors que l'épithélium post-natal serait exclusivement généré à partir des cellules Lgr5$^+$ (Mustata et al., 2013). Notons néanmoins

que les cellules Lgr5+ ne semblent pas dériver des cellules Cnx43+ et que ces deux types cellulaires coexistent dans des proportions inverses lors des stades de développement embryonnaires.

IV. La niche des cellules souches intestinales adultes : un équilibre fin entre différenciation et prolifération

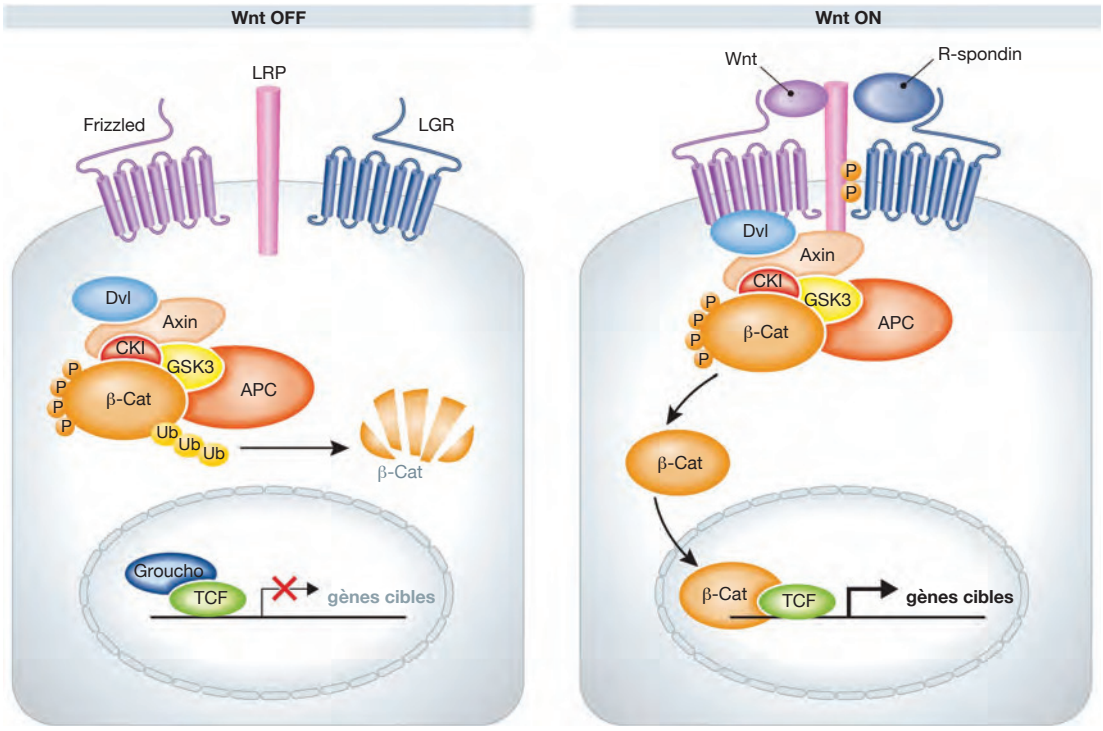
L'homéostasie de l'épithélium intestinal est assurée par l'auto-renouvellement et la différenciation des CSI. Pour préserver l'équilibre entre ces processus, les CSI résident dans un microenvironnement très finement régulé appelé « niche » (Schofield, 1978). Composée de différents types cellulaires et d'une matrice extracellulaire la niche procure aux cellules souches l'ensemble des signaux qui régulent leurs fonctions (Lander et al., 2012). La niche des CSI désigne donc la région des cryptes au sein de laquelle sont concentrées les molécules modulatrices des voies de signalisation Wnt, Notch, Bmp, Egf et Hedgehog.

A. Voies de signalisation au sein de la niche des CSI

1. La voie de signalisation Wnt

La voie canonique de Wnt joue un rôle primordial dans la prolifération des CSI et de leurs progéniteurs. Au sein de l'épithélium intestinal, cette signalisation présente un gradient d'activité le long de l'axe crypte/villus qui résulte de la concentration des protéines Wnt au niveau des cryptes (Pinto et al., 2003), (Gregorieff et al., 2005), (Farin et al., 2016). En migrant vers le sommet du villus, les cellules filles s'éloignent ainsi de la source de ligand Wnt et perdent progressivement leur capacité proliférative.

Au niveau des cryptes, la fixation des protéines Wnt à leurs récepteurs Frizzled et leurs co-récepteurs Lrp5/6 (Lipoprotein receptor-related protein 5 et 6) conduit à l'inactivation du complexe de dégradation de la β-Caténine composé des protéines Axine, Apc (Adenomatous Polyposis Coli), Gsk3β (Glycogen Synthase Kinase 3β) et Ck1 (Casein Kinase 1). La β-Caténine ainsi stabilisée est alors transloquée dans le noyau où elle lie les facteurs de transcriptions Tcf/Lef (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) et induit l'expression d'une série de gènes cibles impliqués notamment dans la prolifération et le cycle



<u>Figure 8 :</u> Signalisation de la voie canonique de Wnt

En absence de ligand Wnt (**Wnt OFF**), la β-Caténine cytoplasmique est ciblées par le complexe de dégradation Apc/Axine/Gsk3β/Ck1. Phosphorylée et ubiquitinée elle est adressée au protéasome pour y être dégradée. Les facteurs de transcription Tcf liés à des complexes répresseurs, tels que Groucho, inhibent la transcription des gènes cibles de la voie Wnt.
En présence de protéines diffusibles Wnt (**Wnt ON**) le complexe de dégradation de la β-Caténine est inactivé. La β-Caténine est alors transloquée dans le noyau où elle s'associent avec les facteurs de transcription Tcf/Lef pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Wnt tels que *Cycline D,c-Myc*,.. Les récepteurs Lgr et leurs ligands R-Spondin potentialisent la signalisation Wnt. Les gènes codant pour les récepteurs Lgr sont des gènes cibles de la voie canonique Wnt. Adapté de Schuijers and Clevers, 2012

cellulaire, tels que *c-Myc, Cycline D*, ... **(Figure 8)**. Parmi ces gènes cibles se trouvent également les gènes *Lgr5, Rnf43 et Znrf3* intervenant respectivement dans les rétrocontrôles positifs et négatifs de la voie Wnt. En présence de son ligand R-Spondin, le récepteur transmembranaire Lgr5 amplifie la signalisation Wnt (Carmon et al., 2011), (Carmon et al., 2012), (de Lau et al., 2011). A l'inverse les ubiquitines ligases E3 transmembranaires Rnf43 et Znrf3 régulent la signalisation Wnt en induisant l'endocytose puis la dégradation des récepteurs Frizzled et de leurs co-récepteurs Lrp5/6 (Hao et al., 2012), (Koo et al., 2012).

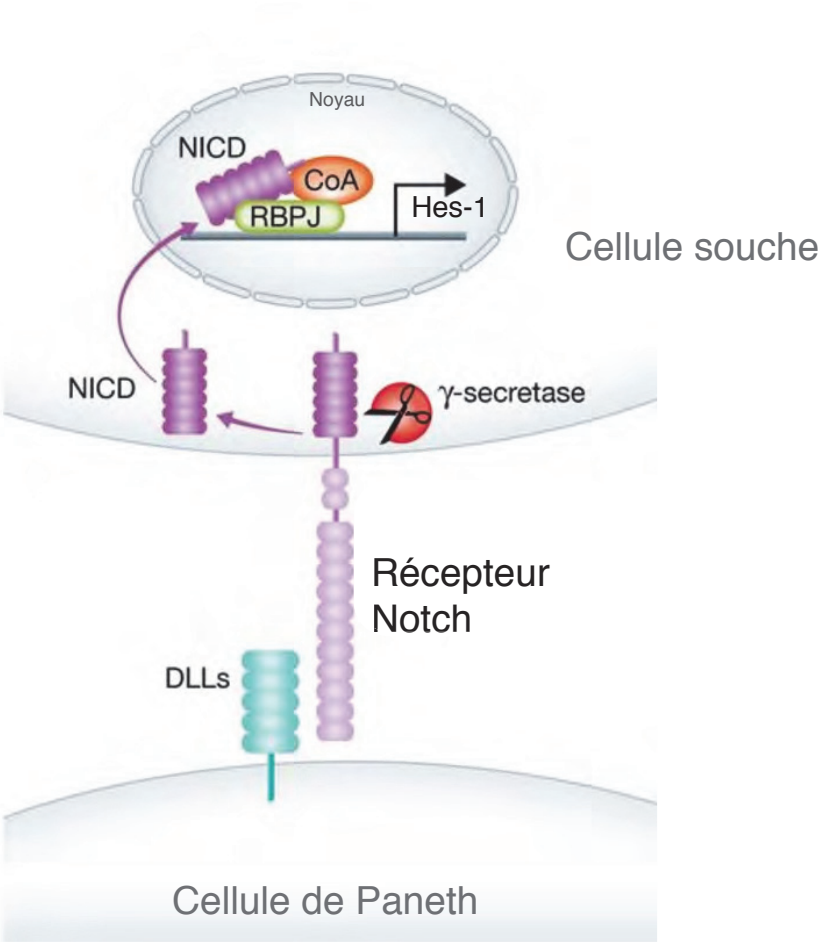
Au niveau des villi, en absence de stimulation Wnt, la β-Caténine cytoplasmique est ciblée par le complexe de dégradation Axine/Apc/Gsk3β/Ck1 et est phosphorylée sur de nombreux résidus N-terminaux. La β-Caténine phosphorylée est alors ubiquitinée puis dégradée par le protéasome. En absence de β-Caténine nucléaire les facteurs de transcription Tcf se lient à des protéines telles que Groucho, afin de former des complexes répresseurs inhibant la transcription des gènes cibles de la voie Wnt et inhibant de ce fait la prolifération cellulaire (Cavallo et al., 1998).

L'importance de cette voie de signalisation dans la prolifération du compartiment souche adulte fut mise en évidence grâce la génération de modèles murins présentant une altération génétique de cette voie.

L'inactivation de la voie Wnt/β-Caténine *via* (1) la délétion conditionnelle dans l'épithélium intestinal des gènes *Ctnnb1* (codant pour la β-Caténine) ou *Tcf7l2* (également appelé *Tcf4*) (Fevr et al., 2007), (van Es et al., 2012b) ou *via* (2) l'expression ectopique d'antagonistes tel que Dkk1 (Dikkopft-1) (Pinto et al., 2003), (Kuhnert et al., 2004) conduit à la perte des CSI et des cryptes. Ces conséquences dramatiques résultent d'un arrêt de l'activité proliférative de l'épithélium intestinal, et d'une augmentation de la différenciation. Quelques jours seulement après la perte du compartiment prolifératif l'épithélium intestinal dégénère, les cellules différenciées éliminées en haut des villi n'étant plus remplacées.

A l'inverse, l'activation constitutive de la voie Wnt/β-Caténine dans l'épithélium intestinal, *via* la délétion conditionnelle du gène *Apc* par exemple, conduit à un élargissement des cryptes et du compartiment prolifératif, ainsi qu'à une altération de la différenciation et de la migration cellulaire (Sansom et al., 2004), (Andreu et al., 2005). Il a également été montré que l'hyper-activation de la voie Wnt spécifiquement dans les CSI Lgr5^{+} suffit à induire la transformation immédiate de ces cellules et la formation de néoplasies (Barker et al., 2009), (Koch, 2017). De façon similaire la sur-expression de ligands R-Spondin ou la délétion simultanée des régulateurs négatifs de la voie Wnt, Rnf43 et Znfr3 conduisent à la formation d'hyperplasies intestinales (Kim et al., 2005), (Carmon et al., 2011).

Outre son importance dans la prolifération du compartiment souche intestinal, la voie canonique de Wnt joue un rôle primordial dans le développement et la différenciation des



<u>Figure 9 :</u> Voie de signalisation Notch

Les cellules de Paneth adjacentes aux CSI, présentent à leur surface les ligands Notch Dll1 et Dll4. Les CSI expriment les récepteurs Notch-1 et Notch-2. L'activation de la signalisation Notch au sein des CSI induit des clivages protéolytiques des récepteurs Notch par des métalloprotéases et γ-sécrétases. Ceux-ci conduisent à la génération d'un fragment intracellulaire NICD (Notch Intracellular Domain) qui est alors transporté dans le noyau où il intéragit avec le facteur de transcription Rbpj (Recombination signal binding protein for immunoglobulin region) et régule l'expression de facteurs de transcription tels que Hes-1. Le facteur de transcription Hes-1 régule à son tour l'expression d'autres facteurs de transcription et inhibe notamment celle du facteur de transcription Math1, indispensable à l'établissement du lignage sécréteur. Adapté de Yin and Karp, 2015.

cellules de Paneth, localisées au cœur du gradient des protéines Wnt (Sansom et al., 2004), (Andreu et al., 2005), (Andreu et al., 2008), **(Figure 10)**. Enfin, cette voie de signalisation présente également une importance notoire dans le positionnement des cellules le long de l'axe crypte/villus *via* la régulation transcriptionnelle des récepteurs EphB.

Les récepteurs EphB et leurs ligands EphrinB sont particulièrement connus pour leur rôle dans la répulsion cellulaire. Ainsi, l'expression des récepteurs EphB à la surface des cellules appartenant aux cryptes permettrait de maintenir celles ci éloignées des cellules différenciées des villi exprimant les ligands EphrinB (Noren and Pasquale, 2004). La signalisation Wnt contrôle le gradient EphB-EphrinB en maintenant l'expression des récepteurs EphB dans les cellules localisées dans les cryptes et en inhibant l'expression de leur ligand (Batlle et al., 2002). Après différenciation au niveau des TA, l'expression des récepteurs EphB est abolie au sein des cellules et celles des ligands EphrinB est initiée.

2. La voie de signalisation Notch

Tout comme la voie Wnt, la voie de signalisation Notch est essentielle à l'auto-renouvellement des CSI et à leur prolifération. Outre ces fonctions, cette signalisation est également un élément central de la différenciation cellulaire et de la spécification entre les lignages absorptif et sécréteur. Dans l'épithélium intestinal les récepteurs Notch sont spécifiquement exprimés par les cellules épithéliales de la crypte limitant ainsi l'activité de cette signalisation à ce compartiment (Schroder and Gossler, 2002).

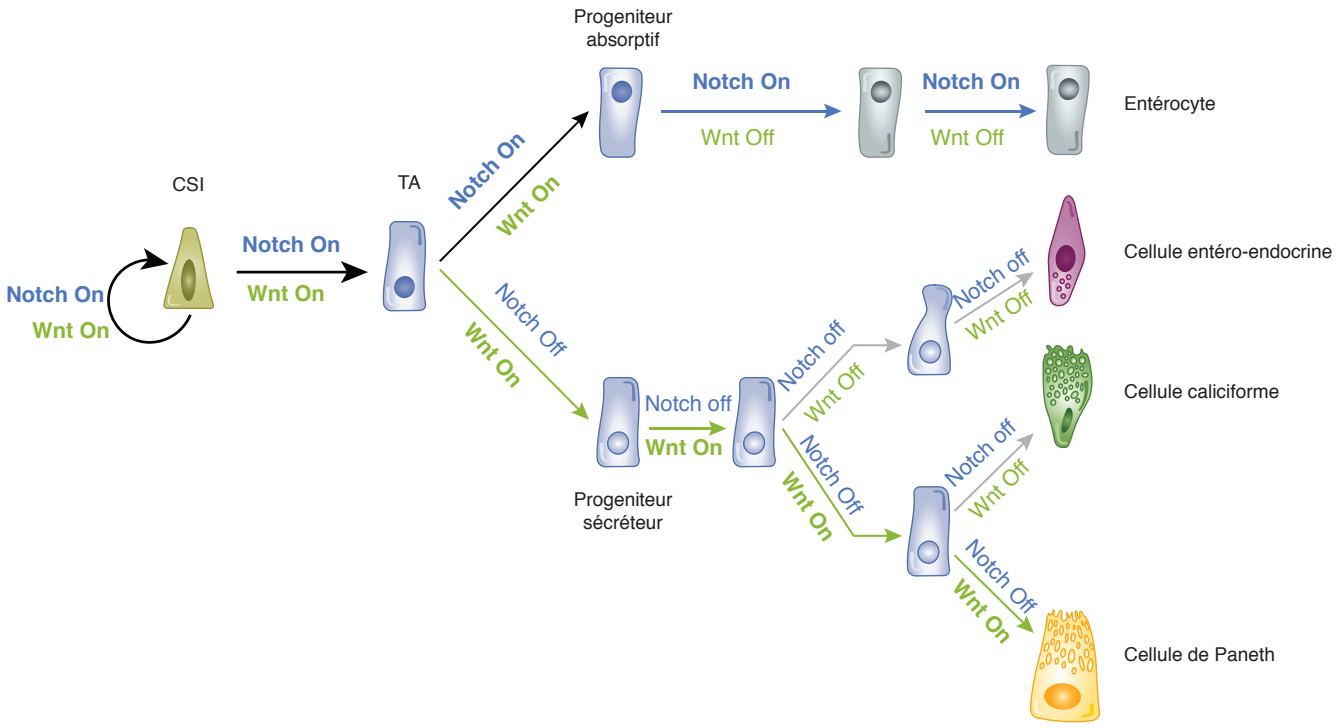
Contrairement à la plupart des facteurs diffusibles qui constituent la niche des CSI, les ligands des récepteurs Notch (Delta (Dll 1-4) ou Jagged (Jag 1-2)) sont ancrés à la membrane cellulaire. L'activation de cette voie de signalisation requiert donc un contact direct entre cellules adjacentes. Suite à l'interaction avec l'un de leurs ligands, les récepteurs Notch sont sujets à des clivages protéolytiques séquentiels orchestrés par des métalloprotéases et des γ-sécrétases. Ces clivages conduisent à la génération d'un fragment intracellulaire appelé NICD (Notch Intracellular Domain) qui est transloqué dans le noyau afin d'interagir avec le facteur de transcription Rbpjκ (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region) et de réguler l'expression de gènes cibles tels que les facteurs de transcription Hes (Hairy and enhancer of split) par exemple **(Figure 9)**.

Au sein des cryptes de l'épithélium intestinal, la signalisation Notch est particulièrement active dans les CSI qui expriment à leur surface les récepteurs Notch-1 et -2 (Schroder and Gossler, 2002) (Sander and Powell, 2004), (Vooijs et al., 2007), (Fre et al.,

2011). La génération de modèles murins transgéniques présentant des altérations de voie de signalisation permit de mettre en évidence le rôle prépondérant de celle-ci dans le maintien des CSI et la prolifération du compartiment souche. En effet, la délétion conditionnelle des récepteurs Notch-1 et -2 dans l'épithélium intestinal adulte conduit à la différenciation des cellules proliératives de la crypte en cellules sécrétrices de mucus, et de ce fait à la perte des CSI (Riccio et al., 2008). Ce phénotype fut également observé chez les modèles murins présentant une invalidation conditionnelle du gène *Rbpjκ* (van Es et al., 2005), une inactivation simultanée des gènes codant pour les ligands Notch Dll1 et Dll4 (Pellegrinet et al., 2011), ou encore chez des souris traitées par un inhibiteur des γ-sécrétases (Milano et al., 2004). De plus, en 2012 Van Dussen et *al.* montrèrent que l'expression du marqueur *Olfm4*, spécifique des CSI, est directement régulée par la signalisation Notch (VanDussen et al., 2012).

Les modèles murins d'inactivation de la voie de signalisation Notch dans l'épithélium intestinal témoignent de l'importance de celle-ci dans le maintien du compartiment souche mais également dans la détermination du lignage cellulaire lors de la différenciation des cellules progénitrices TA. Si l'inactivation de la signalisation Notch conduit à la différenciation des cellules TA en cellules sécrétrices, l'activation constitutive de celle-ci, conduit à l'inverse à une altération du lignage sécréteur ainsi qu'à une expansion du compartiment proliératif (Stanger et al., 2005), (Fre et al., 2005). La signalisation Notch apparaît donc orienter le devenir des cellules progénitrices TA, en inhibant leur engagement vers le lignage sécréteur et en promouvant leur différenciation en cellules absorbantes. Cette régulation nécessite l'expression du facteur de transcription Hes-1. En effet, suite à l'activation de la voie Notch, l'expression de ce facteur de transcription induit l'inhibition transcriptionnelle de nombreux gènes, dont celle du facteur de transcription Math-1 (Fre et al., 2005), nécessaire à l'établissement du lignage sécréteur (Yang et al., 2001).

La génération de nouvelles cellules progénitrices TA conduit à l'expulsion de la crypte des cellules TA formées antérieurement. Ces dernières perdent ainsi les contacts physiques avec les cellules de la crypte présentant à leur surface les ligands Notch. En cette absence de signalisation Notch, l'inhibition du facteur de transcription Math1 est levée et les cellules se différencient en cellules sécrétrices. Les cellules sécrétrices nouvellement formées inhibent l'expression de leurs récepteurs Notch pour activer celle du ligand Dll1 (van Es et al., 2012c). L'expression de ce dernier activerait alors la signalisation Notch au sein de nouvelles cellules progénitrices TA, non engagées dans le lignage sécréteur, et orienterait celles ci vers le lignage absorbant.



<u>Figure 10:</u> La coopération des voies de signalisations Wnt et Notch contrôle l'auto-renouvellement et la différenciation des CSI.

La voie canonique de Wnt est essentielle à l'auto-renouvellement des CSI ainsi qu'à la prolifération des cellules d'amplification transitoire TA. Cette signalisation est également requise à la différenciation des cellules de Paneth localisées à la base des cryptes intestinales.
La signalisation Notch est également indispensable à l'auto-renouvellement des CSI. De plus, cette signalisation joue un rôle crucial dans la spécification des lignages cellulaires, en inhibant la différenciation des progéniteurs en cellules sécrétrices et en promouvant leur différenciation en cellules absorptives. En absence de signalisation Notch, les progéniteurs se différencient en cellules du lignage sécréteur. Adapté de Sancho et al., 2015

La coopération des voies de signalisations Wnt et Notch apparaît donc essentielle à l'auto-renouvellement des CSI ainsi qu'à leur différenciation en les différents types cellulaires constituant l'épithélium intestinal **(Figure 10)**. Le maintien de l'équilibre entre ces signaux est indispensable à l'homéostasie épithéliale.

3. La voie de signalisation des Bmp

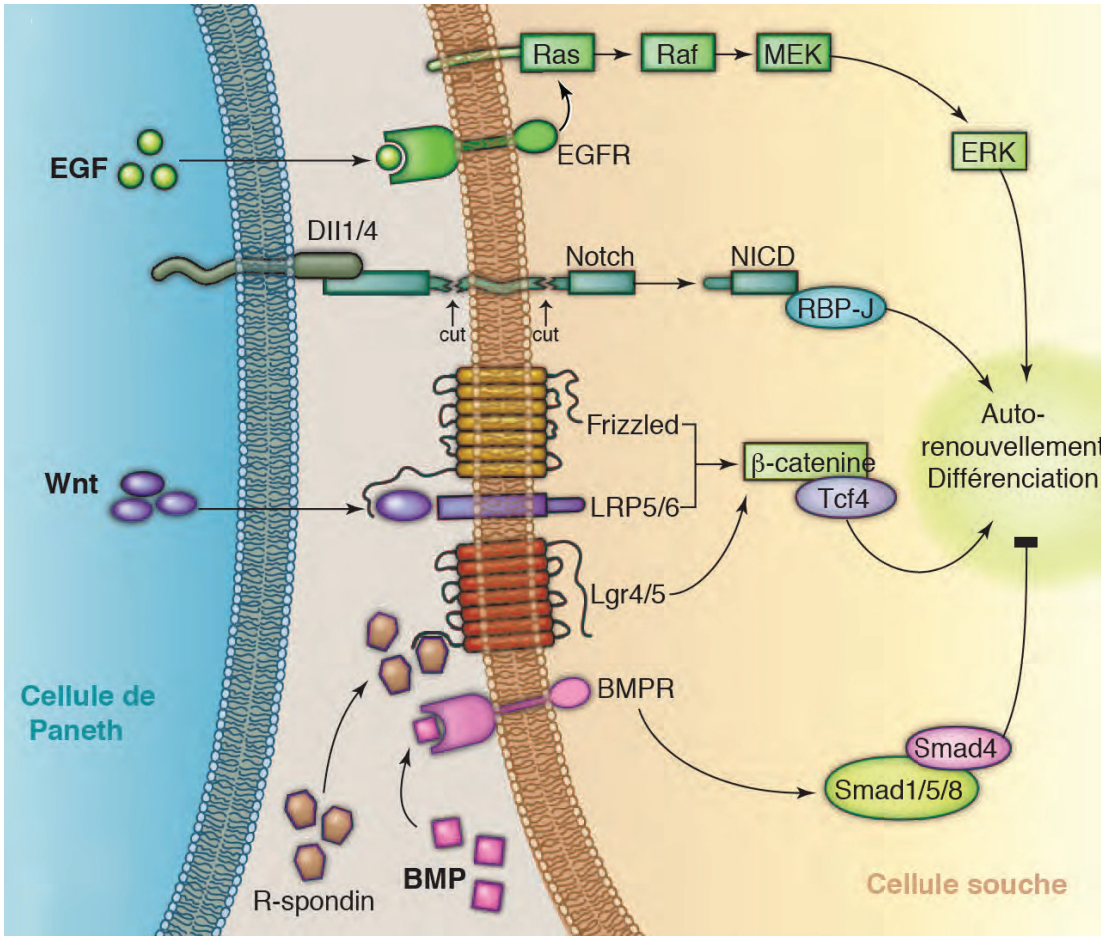
En opposition à la signalisation Wnt, la voie des Bmp a pour rôle d'inhiber l'auto-renouvellement et la prolifération des CSI afin de prévenir la formation d'hyperplasies intestinales. Elle est donc fortement activée au niveau des cellules différenciées des villi, et est fortement réprimée au niveau des cryptes. Cette activité graduelle le long de l'axe crypte/villus résulte de la présence d'inhibiteurs au niveau des cryptes (Kosinski et al., 2007).

La fixation des protéines Bmp à leurs récepteurs à activité tyrosine kinase Bmpr-1/2 conduit à une cascade intracellulaire de phosphorylation au cours de laquelle le complexe R-Smad (Receptor associated smads) composé des protéines Smad-1,-5,-8 est phosphorylé. Suite à cette phosphorylation le complexe R-Smad se lie à la protéine cytoplasmique Smad-4 afin de former un complexe actif capable de transloquer dans le noyau. L'association nucléaire de ce complexe avec divers facteurs de transcription permet alors de réguler l'expression de gènes cibles **(Figure 11)**. Une étude récente révèle qu'*in vitro* la signalisation Bmp serait capable de réprimer l'expression de certains marqueurs souches tels que *Lgr5* ou *Smoc2* (Qi et al., 2017).
In vivo, l'inhibition de la voie de signalisation Bmp *via* (1) l'expression de l'inhibiteur Noggin dans l'épithélium intestinal ou *via* (2) la délétion ubiquitaire du récepteur Bmpr-1 conduit à la présence de cryptes ectopiques et à l'expansion du compartiment souche (Haramis, 2004), (He et al., 2004).

4. La voie de signalisation Egf

La voie de signalisation du facteur de croissance Egf (Epidermal Growth Factor) participe également à la régulation de la prolifération du compartiment souche intestinal **(Figure 11)**.

Dans l'intestin, l'expression du récepteur Egfr est exclusivement observée au niveau



<u>Figure 11 :</u> Voies de signalisation au sein de la niche des cellules souches intestinales.

Les voies de signalisation Wnt, Notch et EGF sont essentielles à l'auto-renouvellement et à la différenciation des CSI.
La voie des Bmp est un régulateur négatif de l'auto-renouvellement des CSI. Elle régule l'équilibre prolifération/différenciation de cette population et prévient la formation d'hyperplasies.
A l'inverse, la fixation des ligands R-Spondin aux récepteurs Lgr5 potentialise la signalisation Wnt et l'auto-renouvellement des CSI.
Issu de Sato et *al.*, 2013

des cryptes (Suzuki et al., 2010), restreignant l'activation de cette voie de signalisation à ce compartiment. L'administration d'un anticorps bloquant le récepteur Egfr à des souris adultes abaisse le nombre de cellules proliferatives par crypte (Suzuki et al., 2010), démontrant l'importance de cette signalisation dans la régulation de la prolifération du compartiment souche.

5. La voie de signalisation Hedgehog

Au cours de l'ontogénèse de l'épithélium intestinal la signalisation Hedgehog est à la base de communications intenses entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent indispensables à la formation des villi. De façon similaire, chez l'adulte les ligands Hh (principalement Ihh) sont produits par les cellules épithéliales différenciées et activent la voie de signalisation Hh au sein des cellules stromales de la *lamina propria* exprimant les récepteurs Ptc. Il est suggéré que la participation de cette voie de signalisation au maintien du compartiment souche intestinal opère de façon indirecte. En effet, cette signalisation régule la maturation et la localisation des cellules stromales jouxtant l'épithélium et sécrétant certaines molécules de signalisation requises à la niche (Kosinski et al., 2010), (Zacharias et al., 2011).

La délétion épithéliale de Ihh qui conduit à des altérations structurelles de *la lamina propria* et de la *muscularis mucosae,* ainsi qu'à une réduction du nombre de myofibroblastes génère également des altérations épithéliales telles qu'une prolifération ectopique au niveau des cryptes et une augmentation du nombre de CSI (Kosinski et al., 2010). La signalisation Hh participe donc au maintien de l'homéostasie épithéliale intestinale *via* la régulation de la *lamina propria* et de la *muscularis mucosae*.

Pour conclure, le maintien du compartiment souche intestinal résulte de l'intrication de multiples voies de signalisation contrôlant auto-renouvellement et différenciation (Figure 11). Pour permettre l'équilibre entre ces processus et préserver l'intégrité de l'épithélium intestinal, ces voies de signalisations sont finement modulées par la présence de molécules agonistes et antagonistes spécifiquement au niveau des cryptes. Ces molécules essentielles à la niche des CSI sont principalement apportées de façon paracrine par les cellules et la matrice extracellulaire présentes dans l'environnement des cellules souches.

B. Les cellules actrices de la niche des CSI

Au niveau des cryptes de l'intestin grêle les CSI Lgr5+ sont adjacentes aux cellules épithéliales de Paneth ainsi qu'à la *lamina propria* sous-jacente. Toutes deux sont sources de facteurs modulant les voies de signalisations indispensables au maintien des fonctions et à la survie des CSI. Les cellules régulant la niche des CSI possèdent donc une origine épithéliale et stromale.

1. Les cellules de Paneth

Localisées à la base des cryptes les cellules de Paneth sont, comme l'ensemble des cellules qui constituent l'épithélium intestinal, issues de la différenciation des CSI au niveau de la zone d'amplification transitoire. Contrairement aux autres cellules différenciées, ces cellules migrent vers la base des cryptes, où elles s'intercalent entre les CSI et résident environ six semaines. En cette position les cellules de Paneth sont en contacts étroits avec les CSI sur environ 80% de leur surface, suggérant leur rôle dans la niche (Sato et al., 2011a).

Initialement décrites pour leur capacité à sécréter un grand nombre d'enzymes et de peptides antimicrobiens (Bevins and Salzman, 2011), les cellules de Paneth sécrètent également des facteurs de croissance, cytokines ... L'analyse transcriptomique de ces cellules révéla par exemple des taux d'expression importants des facteurs de croissance Wnt3 et Egf ainsi que des ligands Notch Dll1 et Dll4 (Sato et al., 2011a), modulateurs essentiels des voies de signalisation requises au maintien du compartiment souche.
La capacité des cellules de Paneth à promouvoir l'auto-renouvellement et la prolifération des CSI ainsi qu'à inhiber leur différenciation fut mise en évidence lors d'expériences de cultures primaires *ex vivo*. Au cours de celles-ci la co-culture de cellules de Paneth avec des CSI Lgr5+ permit d'augmenter de 70% l'efficacité de formation d'organoïdes intestinaux en comparaison aux cultures de cellules Lgr5+ seules. L'ajout exogène de Wnt3a en absence de cellules de Paneth, suffit à reproduire cet effet (Sato et al., 2011a). Les cellules de Paneth régulent donc l'auto-renouvellement et la prolifération du compartiment souche *via* l'expression de facteurs Wnt notamment. L'expression à leur surface des ligands Dll1 et Dll4 contribue à inhiber la différenciation des cellules souches Lgr5+ adjacentes en cellules sécrétrices (Pellegrinet et al., 2011) **(Figures 10, 11 et 12)**.

Malgré les preuves apportées *ex vivo* de la nécessité des cellules de Paneth dans le maintien de la prolifération et de la multipotence des CSI, le rôle qu'occupe ces dernières

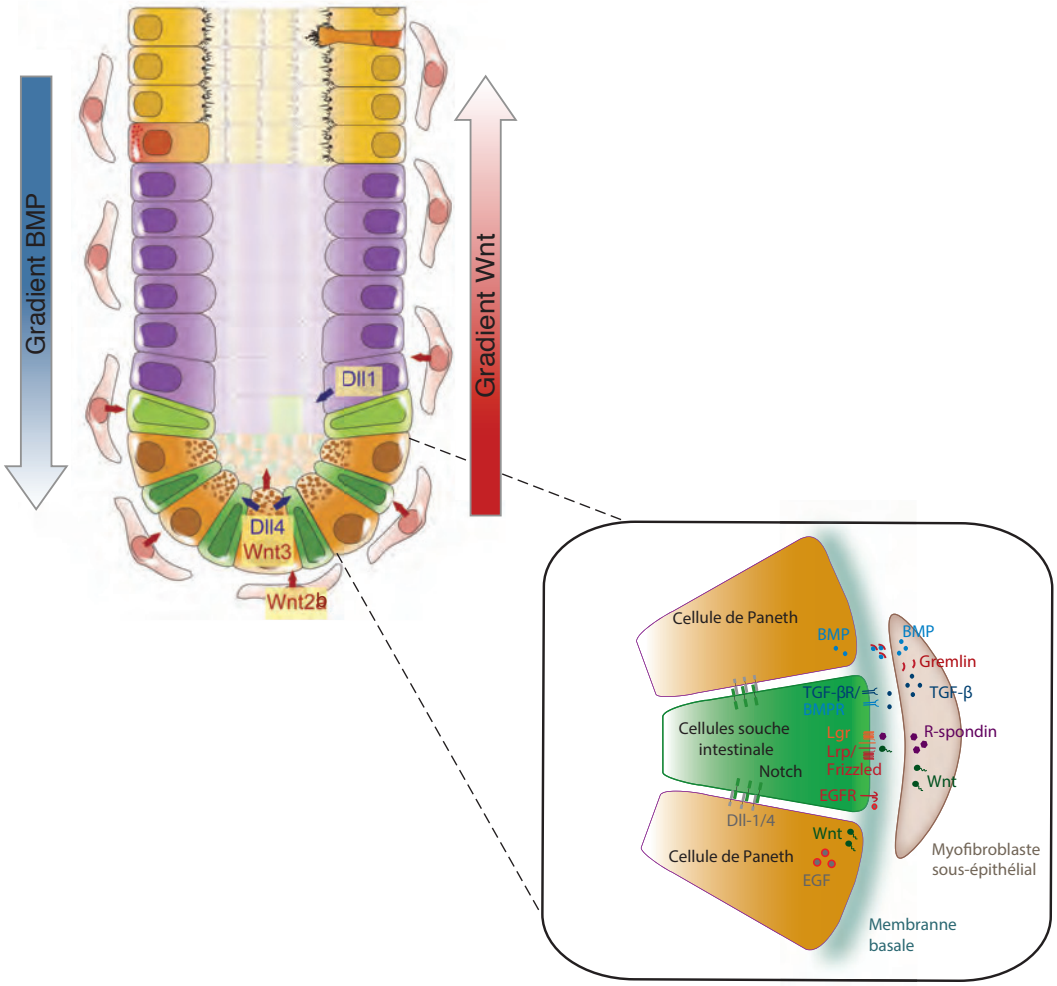
dans la niche des CSI *in vivo* soulève de nombreuses questions et est sujet à controverse. En effet la délétion *in vivo* des cellules de Paneth par de multiples approches génétiques, ne révéla aucune altération du compartiment souche (Garabedian et al., 1997), (Kim et al., 2012), (Durand et al., 2012). Si certaines équipes suggérèrent que ces observations puissent résulter en la difficulté à générer un modèle murin de délétion complète des cellules de Paneth (Clevers, 2013), il fut également proposé que celles-ci soient le fruit de redondances au sein de la niche des CSI. En effet, si la présence de Wnt3a est nécessaire à la culture des organoïdes intestinaux *ex vivo* en absence de cellules de Paneth, la délétion *in vivo* de ce facteur dans l'épithélium intestinal ne semble engendrer aucune incidence sur le compartiment souche (Farin et al., 2012). C'est ainsi que fut proposée l'existence d'une seconde source non épithéliale de Wnt au sein de la niche des CSI.

En conclusion, les cellules de Paneth jouent un rôle unique dans la niche des CSI *in vitro. In vivo* les redondances qui existent avec d'autres sources de facteurs de croissances semblent minimiser ce rôle.

2. Les cellules stromales de la *lamina propria*

La *lamina propria* sous-jacente à l'épithélium intestinal est composée de multiples types cellulaires aux fonctions très diverses. Parmi ces cellules se trouvent notamment des cellules mésenchymales telles que des fibroblastes et des myofibroblastes mais également des péricytes, des lymphocytes, des macrophages … pouvant être sources de facteurs essentiels à la niche des CSI.

Alors que la présence de Wnt3a est requise à la croissance des cellules souches en culture en absence de cellules de Paneth, la délétion spécifique de ce facteur dans l'épithélium intestinal n'engendre aucune incidence sur le maintien du compartiment souche *in vivo*. Suspectant l'existence d'une seconde source non épithéliale de facteurs Wnt, Farin et *al.* étudièrent l'expression de ces facteurs au sein de la *lamina propria* et des couches musculaires lisses intestinales. Ils rapportèrent l'expression des facteurs Wn2b, Wnt4 et Wnt5a au sein de la *lamina propria*. De façon intéressante la mise en culture de ces cellules stromales avec les cellules souches épithéliales Wnt3$^{\Delta/\Delta}$ suffit à restaurer la formation et la croissance d'organoïdes intestinaux. Enfin, une analyse plus approfondie de chacun de ces trois facteurs révéla que seul Wnt2b possède la capacité de restaurer la formation et la croissance d'organoïdes Wnt3$^{\Delta/\Delta}$ (Farin et al., 2012). Les cellules stromales sécrétant Wnt2b constituent donc des acteurs essentiels de la niche des CSI.



<u>Figure 12 :</u> Niche des cellules souches intestinales : signalisations et acteurs.

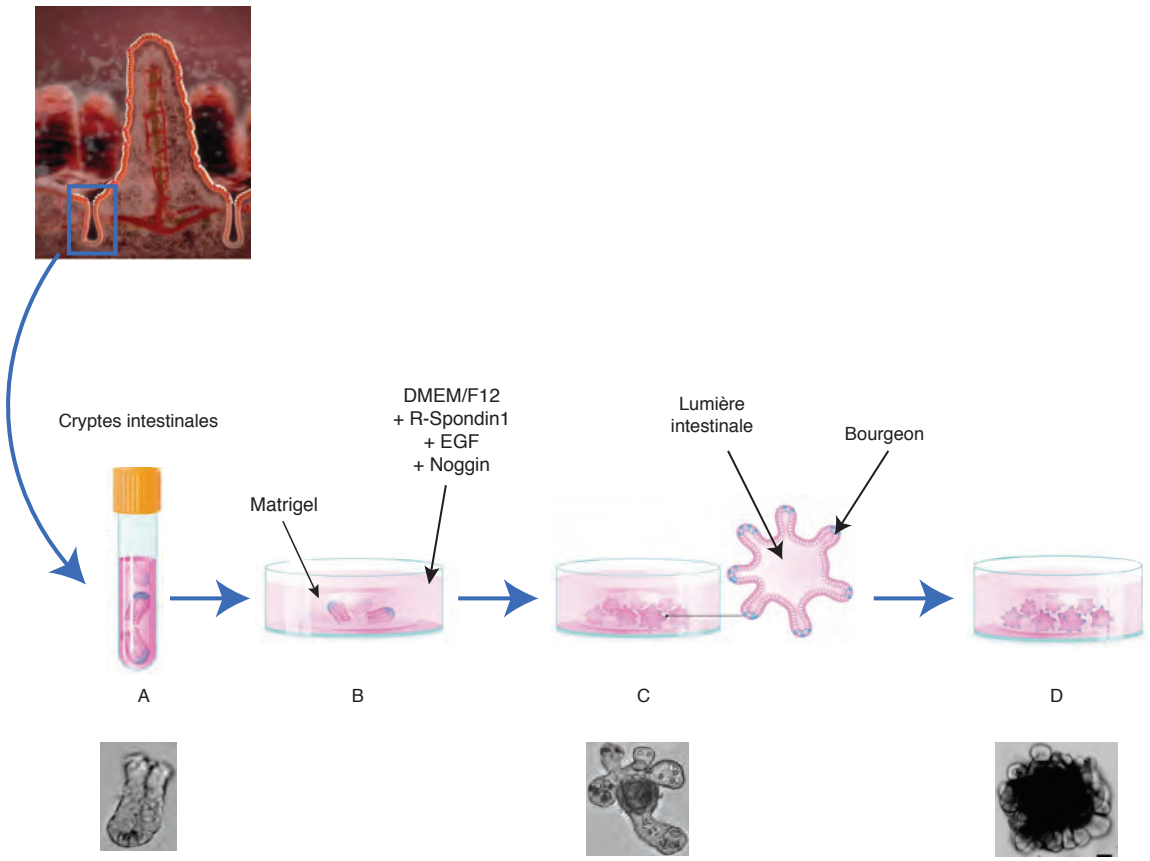
La niche des CSI est définie par plusieurs signalisations régulant l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation du compartiment souche. La présence de molécules modulatrices de ces signalisations au sein de la niche est assurée par les cellules épithéliales de Paneth ainsi que par des cellules stromales dont les myofibroblastes sous-épithéliaux.

L'activité de la voie de signalisation Wnt, nécessaire à l'auto-renouvellement des CSI notamment, décroît graduellement le long de l'axe crypte/villus. Ce gradient est établis par la sécrétion de ligands Wnt au niveau des cryptes par les cellules épithéliales de Paneth ainsi que par les myofibroblastes sous-épithéliaux de la *lamina propria*. Ces derniers sécrètent également des ligands R-Spondin qui potentialisent la voie Wnt au sein des CSI.
L'activité de la voie Bmp, nécessaire à la différenciation cellulaire et au blocage de la prolifération, est inhibée au niveau de la niche des CSI *via* la sécrétion d'antagonistes tels que les Gremlin par les myofibroblastes sous-épithéliaux.
L'activité des voies Notch et EGF est assurée par les cellules de Paneth qui présentent à leur surface les ligands Notch Dll1 et Dll4, et qui sécrètent le facteur Egf.
Adapté de Carulli et al., 2014 et de Date and Sato, 2015.

Au sein de la *lamina propria*, les myofibroblastes sous-épithéliaux (ISEMFs) jouxtent l'épithélium intestinal et ce, particulièrement à la base des cryptes. De part cette proximité avec le compartiment souche ceux ci sont l'objet depuis plusieurs années d'intenses recherches visant à identifier s'ils sont acteurs de la niche des CSI. Comme leur nom l'indique, ces cellules présentent à la fois des caractéristiques des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Elles expriment ainsi les marqueurs α-Sma (alpha smooth muscle actin), Vimentine et Thy-1 (Powell et al., 2011), (Mifflin et al., 2011). *Ex vivo*, ces cellules sont capables de promouvoir la formation, la croissance et la différenciation d'organoïdes intestinaux sur plusieurs passages (Lahar et al., 2011), (Lei et al., 2014). Il fut donc proposé que les myofibroblastes sous-épithéliaux soient une source potentielle de facteurs Wnt. Cette hypothèse fut confirmée par une étude récemment publiée, au cours de laquelle il fut montré qu'une partie des cellules stromales Wnt2b$^+$ étaient aussi α-Sma$^+$ (**Figure 12**). Toutefois, bien que Wnt2b soit exprimé et sécrété par les myofibroblastes sous épithéliaux de la *lamina propria*, ces cellules ne constituent pas l'unique source stromale de ce facteur clé de la signalisation Wnt/β-Caténine. Wnt2b est en effet également exprimé par une autre population de cellules stromales sous épithéliales α-Sma$^-$ et Gli1$^+$ (Valenta et al., 2016). De plus, l'analyse transcriptomique des myofibroblastes sous-épithéliaux α-Sma$^+$, Vimentine$^+$ révéla une importante expression de l'agoniste de la voie Wnt : R-Spondin2 (Lei et al., 2014).

Outre les facteurs Wnt, les inhibiteurs des Bmp représentent également des molécules clés de la niche des CSI. Au sein de l'épithélium intestinal la signalisation Bmp participe à inhiber la prolifération cellulaire et à promouvoir à la différenciation cellulaire le long de l'axe crypte/villus. Or, les cellules mésenchymateuses de la *lamina propria* sont une source importante de Bmp (Li et al., 2007). Afin de préserver le compartiment souche de ces stimuli la niche des CSI doit donc apporter des antagonistes de cette signalisation. Il est montré que les myofibroblastes sous-épithéliaux ainsi que les cellules de la *muscularis mucosae* présents dans l'environnement des cryptes secrètent des inhibiteurs des Bmp tels que Gremlin-1, -2 et Chordin-like-1(Kosinski et al., 2007), (Li et al., 2007), **(Figure 12)**.

A ce jour aucune n'étude n'a rapporté l'existence d'une source non épithéliale de ligand Notch.



<u>Figure 13 :</u> Cultures *ex vivo* d'entéroïdes, selon la méthode de Sato et *al.*

A. Les cryptes de l'épithélium intestinal grêle sont isolées du reste du tissu intestinal par un traitement à l'EDTA ainsi que par des fractionnements mécaniques.

B. La fraction enrichie en crypte, contenant les CSI (en bleues), les cellules de Paneth et des cellules d'amplification transitoire est placée au sein d'une matrice 3D : le Matrigel. Les facteurs de croissances nécessaires au maintien des CSI et à leurs fonctions, n'ayant pas une origine épithéliale, sont apportés par un milieu supplémenté en R-Spondin1, Egf et Noggin.

C. Après quelques jours de culture les organoïdes intestinaux se forment. l. Ils présentent (1) des structures semblables aux cryptes intestinales observées *in vivo* appelées bourgeons, au sein desquelles se trouvent les CSI, les cellules de Paneth et les TA et (2) des structures mimant les villi, au dessus des bourgeons, au sein desquelles se trouvent les cellules différenciées constituant les lignages sécréteurs et absorptifs. L'ensemble de ces structures s'organise autour d'un lumen central.

D. Au cours de la culture, le nombre de bourgeons par organoïde croît. La population de CSI est donc enrichie et étendue sous forme d'organoïdes.

En conclusion, de la même façon que l'épithélium et le mésenchyme communiquent lors du développement de l'épithélium intestinal, les cellules épithéliales adultes et les cellules stromales de la *lamina propria* interagissent afin de maintenir l'homéostasie intestinale. Certaines cellules mésenchymateuses situées à proximité immédiate des cryptes de l'épithélium, tels que les myofibroblastes sous-épithéliaux, participent activement à la niche des CSI *via* l'expression de molécules régulant l'auto-renouvellement et la différenciation de celles-ci.

V. La culture de CSI *ex vivo :* apports fondamentaux et thérapeutiques

Comme nous l'avons abordé, la mise en culture des CSI sous forme d'organoïdes a grandement contribué, et contribue encore, à une meilleure compréhension de la niche de ces cellules et plus largement des mécanismes régulant le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal adulte *in vivo*. Ces cultures ont en effet conduit à l'identification d'un grand nombre de facteurs participant à cette niche ainsi qu'à l'identification des types cellulaires les sécrétant. Les difficultés rencontrées au cours des études s'étant attachées à décrire des conditions de cultures adéquates au maintien des CSI *ex vivo*, dans leur état prolifératif et multipotent, témoignent de la complexité de cette niche *in vivo*.

Aujourd'hui, les efforts développés ont conduit à l'avènement de deux techniques permettant de cultiver *ex vivo* des organoïdes intestinaux sur plusieurs mois. Ces organoïdes également appelés entéroïdes ou mini intestins se présentent sous la forme de cultures 3D au sein desquelles sont observées des structures semblables aux cryptes et aux villi. Constituées de l'ensemble des différents types cellulaires de l'épithélium intestinal *in vivo* ces structures s'organisent autour d'un lumen central dans lequel les cellules apoptotiques sont déversées. L'organisation des différents types cellulaires reflète parfaitement celle observée *in vivo* : les CSI et les cellules de Paneth sont localisées au niveau des bourgeons qui constituent la base des structures cryptes, et les cellules différenciées sont localisées au plus près du lumen (Sato et al., 2009), (**Figure 13**).

La première technique, proposée par Sato et *al.* en 2009, représente une culture de cellules épithéliale uniquement. Cette technique repose sur la mise en culture de cryptes intestinales dans des conditions mimant au plus près l'environnement des cryptes *in vivo*. Au

cours de celle ci l'épithélium intestinal est dissocié du reste du tissu intestinal par un traitement à l'EDTA et est ensuite fractionné mécaniquement afin de séparer les cryptes des villi. La fraction enrichie en cryptes, qui contient les CSI, les cellules de Paneth ainsi que quelques cellules TA est alors placée dans du Matrigel. Cette matrice riche en laminines, collagènes, et héparanes sulfates permet de mimer les propriétés physiques et chimiques de la lame basale sous jacente à l'épithélium intestinal *in vivo.* En effet, en plus de constituer un support physique à la croissance épithéliale, cette matrice favorise également les signalisations lame basale/cellules épithéliales nécessaires à la survie de ces dernières (Kleinman et al., 1986), (Kleinman and Martin, 2005), (Gjorevski et al., 2016). Les facteurs de croissance essentiels au maintien des CSI sont apportés *via* un milieu de culture dépourvu de sérum et supplémenté en R-Spondin1, ligand du récepteur Lgr5, en Egf ainsi qu'en Noggin, inhibiteur des Bmp **(Figure 13).** La signalisation Notch est pour sa part maintenue activée grâce aux cellules de Paneth contenues dans les cryptes mises en culture, présentant à leur surface les ligands Dll1 et Dll4 (Sato et al., 2009).

Bien que cette méthode permette de maintenir et d'amplifier les CSI *in vitro* sur plusieurs passages, celle-ci ne l'autorise que sous la forme d'entéroïdes, *i.e* sous la forme d'une culture hétérogène de CSI et de cellules différenciées. Ces conditions de culture sont en effet inefficaces à l'amplification des CSI Lgr5$^+$ seules sous la forme d'une culture homogène de cellules multipotentes non différenciées. Elle sont également inefficaces à la mise en culture des CSI Lgr5$^+$ en absence des cellules de Paneth (Sato et al., 2009), (Sato et al., 2011a). L'expansion *ex vivo* d'une population pure de CSI Lgr5$^+$ requiert l'ajout de molécules modulant les voies de signalisation Wnt et Notch, au milieu de culture classique (composé de R-Spondin1, Egf et Noggin). L'addition combinée au milieu de culture de CHIR99021, inhibiteur de la GSK3β ainsi que d'acide valproïque, inhibiteur des histones déacétylases connu pour son rôle dans l'activation de la signalisation Notch permet respectivement d'augmenter l'auto-renouvellement des CSI et d'inhiber leur différenciation (Yin et al., 2014).

La seconde technique, également proposée en 2009, repose sur la co-culture de cryptes épithéliales avec les cellules stromales (Ootani et al., 2009). Comme nous l'avons abordé précédemment les cellules stromales sont parties intégrantes de la niche des CSI. La mise en culture de celles-ci avec les cryptes épithéliales semble suffire à recréer à niche des CSI et à promouvoir la formation d'entéroïdes *ex vivo,* sans ajout de facteurs de croissance au milieu de culture. L'ajout exogène de R-Spondin1 ou R-Spondin2 permet néanmoins de prolonger le temps de culture de ces organoïdes intestinaux. De façon intéressante la contribution des cellules stromales à la culture des entéroïdes semble décroître avec l'âge. En effet la co-culture de cryptes épithéliales avec des cellules stromales adultes révèlent une diminution de la capacité proliférative des CSI au fur et à mesure du temps, en comparaison

aux co-cultures réalisées avec des cellules stromales issues d'intestins néonataux (Ootani et al., 2009), (Lei et al., 2014). En 2014, Lei et *al.* proposent que cette différence d'efficacité à supporter la croissance des entéroïdes soit le fruit d'expressions différentielles de facteurs entre les populations de myofibroblastes sous-épithéliaux adultes et néonataux. En effet, l'analyse transcriptomique de ces deux populations révéla un fort taux d'expression du facteur R-Spondin2 au sein des myofibroblastes sous-épithéliaux néonataux, alors que le myofibroblastes sous-épithéliaux adultes présentent une expression très modérée de ce dernier (Lei et al., 2014).

La capacité à pouvoir cultiver des entéroïdes *ex vivo* constitue aujourd'hui un outil puissant pour la recherche fondamentale et clinique. En plus de permettre une meilleure compréhension de la niche des CSI, ces cultures ont également un intérêt thérapeutique indéniable. En effet le système de culture *ex vivo* d'organoïdes intestinaux a été adapté avec succès aux tissus humains (intestins grêles et colon) (Jung et al., 2011), (Sato et al., 2011b). Il est aujourd'hui utilisé afin de modéliser les différentes maladies touchant l'intestin, permettant ainsi de tester l'effet de diverses molécules, mais est également utilisé dans les approches de thérapies régénératives visant à transplanter du tissu intestinal sain aux patients (pour revues (Leushacke and Barker, 2014), (Date and Sato, 2015)).

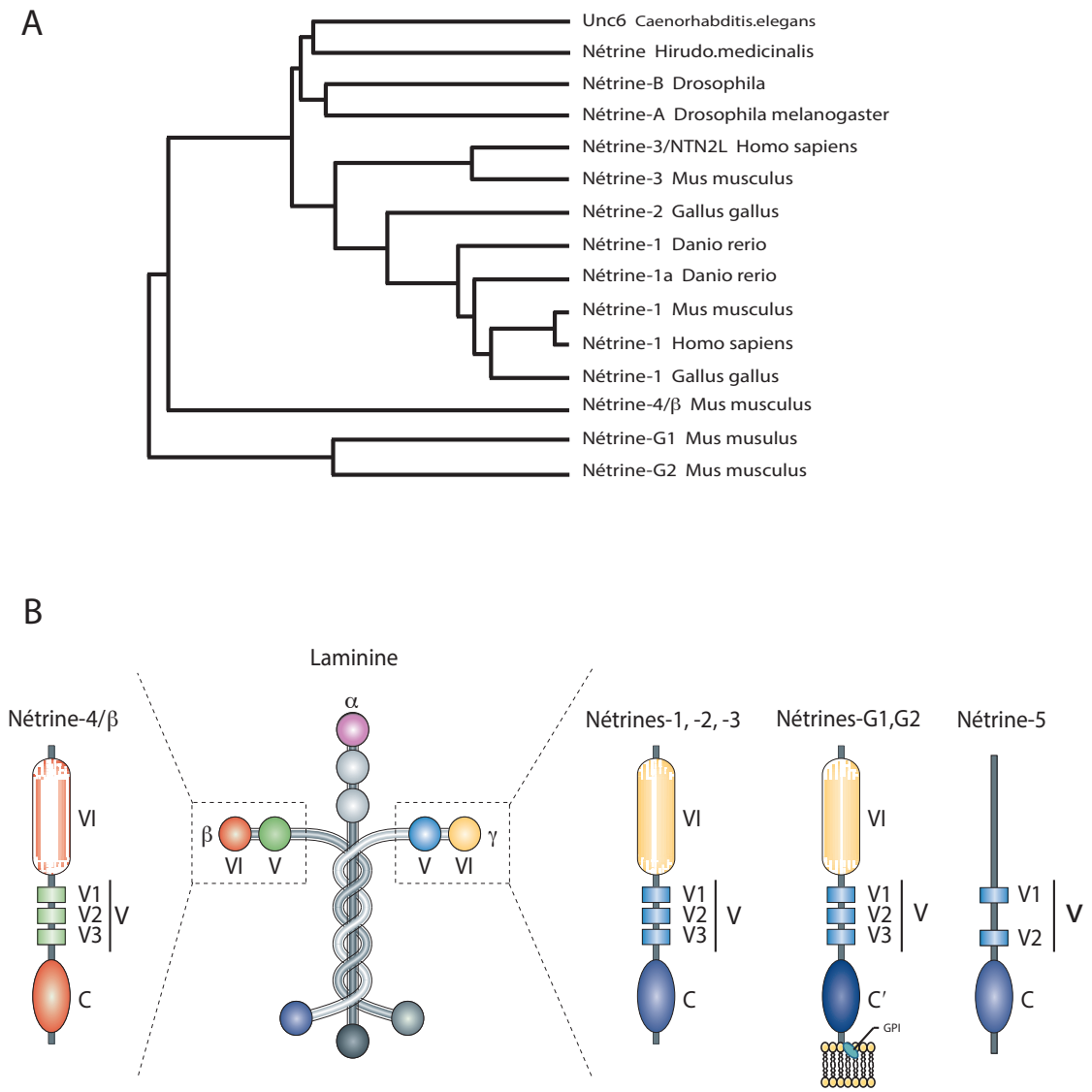
L'étude que nous présentons dans ce manuscrit a pour objectif d'approfondir la compréhension des mécanismes contrôlant l'homéostasie de l'épithélium intestinal, et plus particulièrement d'investiguer si la Nétrine-1, molécule d'intérêt de notre laboratoire largement étudiée pour ses rôles au cours du développement embryonnaire ainsi qu'au cours de la tumorigénèse, pourrait participer à la niche des CSI.

CHAPITRE 3 :

LA NETRINE-1 ET SES RECEPTEURS

Au cours du développement du système nerveux l'établissement de connections neuronales précises réside dans la capacité des fibres neuronales, appelées axones, à croître en direction de leurs cibles au travers d'un réseau dense et complexe. Pour sonder leur environnement à la recherche des signaux les orientant jusqu'à leurs cibles finales, les axones possèdent à leur extrémité distale une structure spécialisée : le cône de croissance. Cette structure mobile perçoit et intègre les multiples signaux environnementaux grâce notamment à la présence de divers récepteurs aux molécules de guidage axonal exprimés à sa surface. Présentes dans le milieu extracellulaire, les molécules de guidage axonal transmettent au cône de croissance des signaux attractifs ou répulsifs permettant de ré-orienter et de moduler la croissance de l'axone. Les Nétrines représentent l'une des familles majeures de molécules de guidage axonal (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Issu du sanskrit « netr » leur nom signifie « celui qui guide ».

Depuis leur découverte, à la fin du XXème siècle, les Nétrines sont majoritairement étudiées pour leur rôle dans la mise en place du système nerveux. Néanmoins, les études démontrant leur implication dans le développement et le maintien de l'homéostasie de tissus variés sont de plus en plus nombreuses. Nous aborderons au cours de ce chapitre, de façon non exhaustive, divers rôles qu'occupe la Nétrine-1 dans différents tissus où elle est exprimée.



<u>Figure 14 :</u> La famille des Nétrines : structures et évolution

A. Arbre phylogénétique des Nétrines illustrant les distances inter-génétiques entre les membres de différentes espèces de vertébrés (le poisson zèbre Danio rerio, le poulet Gallus gallus, la souris Mus musculus, et l'Homme Homo sapiens) et d'invertébrés (le nématode Caenorhabditis elegans, la drosophile Drosophila melanogaster, la sangsue Hirudo medicinalis).

B. Représentation schématique des structures des Nétrines des vertébrés. La plupart des Nétrines possèdent trois domaines : le domaine N terminal appelé domaine VI (absent chez la Nétrine-5), homologue au domaine VI des Laminines ; le domaine central appelé domaine V, constitué de trois répétitions EGF (à l'exception de la Nétrine-5 qui n'en présente que deux), homologue au domaine V des Laminines ; le domaine C terminal appelé domaine C chez les Nétrines sécrétées et C' chez les Nétrines ancrées à la membrane par une ancre GPI. Les Nétrines 1,2,3, G1, G2 et potentiellement 5 sont plus proches de la chaîne γ des Laminines alors que la Nétrine-4 est pour sa part plus proche de la chaîne β. Adapté de Cirulli and Yebra, 2007.

I. La famille des Nétrines : Évolution et structures

A. La famille des Nétrines et son évolution

La première forme de Nétrine, nommée Unc-6 (Uncoordinated-6), fut identifiée en 1990, chez *Caenorhabditis elegans,* lors d'un crible génétique visant à isoler les gènes impliqués dans la migration neuronale et le guidage axonal (Hedgecock et al., 1990). Quelques années plus tard, en 1994, le groupe de Marc Tessier-Lavigne purifia et clona pour la première fois chez les vertébrés (chez le poulet), deux protéines homologues à Unc-6. Celles-ci reçurent alors le nom de Nétrine-1 et Nétrine-2, de par leur capacité à promouvoir et guider la croissance des axones commissuraux de la moelle épinière (Serafini et al., 1994).

Depuis, de nombreux orthologues à Unc-6 ont été identifiés au sein de diverses espèces. Chez les invertébrés, des orthologues sont ainsi décrits chez *Drosophila melanogaster* (Nétrine A et Nétrine B) (Harris et al., 1996), chez la sangsue (Nétrine) (Gan et al., 1999) ou chez l'anémone de mer (Nv Nétrine) (Matus et al., 2006). Chez les vertébrés, ces orthologues sont retrouvés chez le poulet (Nétrine-1 et Nétrine-2) (Serafini et al., 1994), le poisson zèbre (Nétrine-1a, -1b, -2 et -4) (Park et al., 2005), le xénope, la souris, le rat, les singes et l'Homme par exemple. La famille des Nétrines représente donc une famille de protéines particulièrement conservée au cours de l'évolution, notamment chez les organismes à symétrie bilatérale **(Figure 14A)**. En effet, chez ces derniers le croisement de l'axe de symétrie par certains neurones (les neurones commissuraux) est dépendante de l'expression des Nétrines.

Chez les mammifères, la diversité des formes de Nétrines est relativement importante. Six formes ont jusque là été décrites. Quatre d'entres elles constituent des formes sécrétées : les Nétrines-1, -3, -4 et -5 (Serafini et al., 1996), (Wang et al., 1999), (Yin et al., 2000), (Yamagishi et al., 2015), alors que les deux autres, nommées Nétrines-G1 et -G2 (Nakashiba et al., 2002) sont séquestrées à la membrane par une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol). La Nétrine-2, décrite chez les oiseaux et le poisson zèbre, n'est pas retrouvée chez les mammifères.

B. Caractéristiques structurales des Nétrines

Les Nétrines constituent une famille de protéines extracellulaires structurellement apparentée à celle des Laminines, protéines hétérotrimériques essentielles de la matrice extracellulaire, composées de chaines α, β, et γ.
D'environ 70 kDa, les Nétrines sont composées de trois domaines distincts : (1) le domaine N-terminal globulaire, appelé domaine VI ; (2) le domaine central constitué de trois répétitions EGF (V1, V2, V3), appelé domaine V; et (3) le domaine C-terminal, appelé domaine C pour les Nétrines sécrétées, et C' pour les Nétrines-G ancrées à la membrane (Cirulli and Yebra, 2007). En figure d'exception la Nétrine-5, récemment décrite, ne possède pas de domaine VI et son domaine V ne contient que deux répétitions EGF (Yamagishi et al., 2015) **(Figure 14B)**.
Les domaines VI et V des Nétrines sont respectivement homologues aux domaines VI et V des Laminines. Dans le cas des Nétrines-1 à -3 et G ceux-ci sont particulièrement similaires aux domaines VI et V de la chaine γ des Laminines, alors que dans le cas de la Nétrine-4 ces domaines sont plus proches des domaines VI et V de la chaine β des Laminines, d'où son autre nom : Nétrine-β.
Contrairement aux domaines VI et V, le domaine C-terminal des Nétrines ne présente aucune homologie avec les Laminines. Enrichi en acides aminés positivement chargés ce domaine possède une forte affinité pour les héparines et pourrait ainsi contribuer à séquestrer les Nétrines sécrétées dans la matrice extracellulaire *via* des interactions avec les héparanes sulfate par exemple (Kappler et al., 2000).

La Nétrine-1 (Ntn1) est le membre le plus étudié de la famille des Nétrines et son profil d'expression spatio-temporel est assez bien établi. Nous verrons que celle-ci est majoritairement exprimée dans le système nerveux central (SNC) en développement mais est également exprimée dans un large spectre de tissus et organes, aussi bien lors du développement embryonnaire que chez l'adulte. De façon intéressante, les taux d'expression de la Nétrine-1 observés chez l'adulte apparaissent toutefois beaucoup plus faibles qu'au cours du développement.

Découverte comme molécule de guidage axonale, la Nétrine-1 constitue aujourd'hui une molécule pléïotropique dont les fonctions diverses résultent notamment du répertoire varié des récepteurs qu'elle possède. Nous reviendrons plus en détail sur ses fonctions lors du paragraphe III.

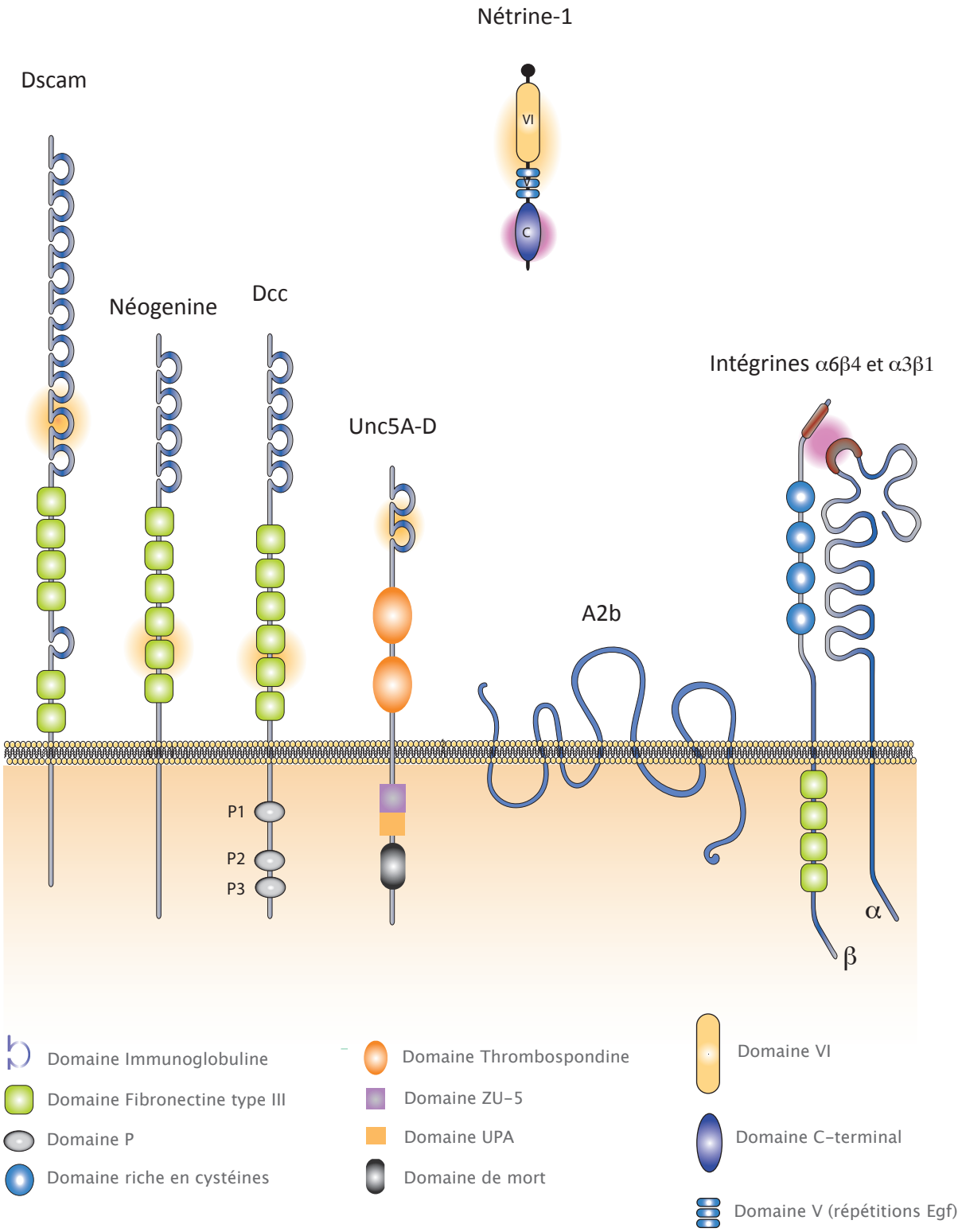
II. Les récepteurs à la Nétrine-1

A. Principaux récepteurs à la Nétrine-1

1. Dcc

Dcc pour Deleted in Colorectal Cancer fut identifié chez l'Homme suite à l'analyse d'une région du chromosome 18q21 présentant dans 70% des cancers colorectaux une perte d'hétérozygotie. La présence de *Dcc* dans cette région perdue valut à ce récepteur son appellation et conduit la communauté scientifique à envisager celui-ci en tant que gène suppresseur de tumeur dans un premier temps (Fearon et al., 1990). Ce n'est que quelques années plus tard, en 1996, que fut établie la relation récepteur/ligand entre Dcc et la Nétrine-1.

Historiquement, Dcc et Unc5 (que nous aborderons un peu plus loin) furent les premiers récepteurs décrits de la Nétrine-1. Lors du crible génétique réalisé chez *C.elegans* en 1990, Hedgecock et *al.* observèrent que le phénotype « uncoordinated » des mutants *unc-6,* impliquant des défauts de projections axonales ventrales et dorsales, était également retrouvé chez les mutants dépourvus des récepteurs Unc-40 et Unc-5. Or, au cours d'une étude réalisée en 1996, Chan et *al.* identifièrent *unc-40* et *unc-5* comme homologues respectifs de *Dcc* et *Unc-5* chez les vertébrés (Chan et al., 1996). Une seconde étude, publiée la même année, appuya cette découverte en révélant qu'au cours du développement embryonnaire des mammifères, le récepteur Dcc est exprimé par les neurones commissuraux de la moelle épinière (Keino-Masu et al., 1996) dont les projections axonales ventrales répondent à la présence de Nétrine-1 (Serafini et al., 1996). Ces études mirent ainsi en lumière l'action attractive de la Nétrine-1 sur les projections axonales des commissuraux exprimant le récepteur Dcc. Ce rôle fut définitivement corroboré un an plus tard par la génération d'un modèle murin de délétion constitutive du gène *Dcc* (Fazeli et al., 1997). De façon similaire aux mutants *Ntn1* (Serafini et al., 1996), (Yung et al., 2015), (Dominici et al., 2017), les animaux invalidés pour le gène *Dcc* meurent dans les heures après leur naissance (Fazeli et al., 1997).



<u>Figure 15:</u> Les Récepteurs à la Nétrine-1

Représentation schématique de la Nétrine-1 et de ses différents récepteurs.
La Nétrine-1 se lie via son domaine VI (en jaune) ou V (en bleu) aux récepteurs transmembranaires Dcc, Néogénine, Dscam, Unc5-A-D, A2b et aux intégrines α6β4 et α3β1.
Les sites putatifs ou confirmés de la Nétrine-1 à ses récepteurs sont indiqués par des halos de couleur jaune et violette.

- **Profil d'expression**

Au cours du développement embryonnaire, Dcc est majoritairement et fortement exprimé dans de nombreuses structures du SNC. Son expression est également observée dans le système nerveux périphérique (Gad et al., 1997) (Barallobre et al., 2005), (Jiang et al., 2003).

Chez l'adulte l'expression de Dcc est relativement faible. Celle-ci est une nouvelle fois principalement observée dans le SNC mais dans un nombre de structures bien moindre qu'au cours du développement. Dcc est ainsi exprimé par les neurones dopaminergiques de la substance noire (Osborne et al., 2005), ainsi que dans les régions où perdure la neurogénèse (Gad et al., 1997). En dehors du SNC, l'expression de Dcc fut majoritairement étudiée dans l'intestin et le colon, de part sa perte d'hétérozygotie dans les cancers colorectaux. Néanmoins, les données qui résultent des différentes études réalisées se révèlent assez contradictoires et sont soumises à controverse. Certaines études affirment en effet que l'expression de Dcc ne serait détectable que dans les phases précoces de développement du système nerveux entérique (lors de la migration des crêtes neurales et de la formation des plexi) (Jiang et al., 2003) et serait ainsi absente de l'intestin adulte. D'autres au contraire révèlent une expression uniforme de Dcc par l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal adulte (Castets et al., 2012). D'autres encore proposent que ce récepteur ne soit exprimé que dans les cellules caliciformes du colon adulte (Hedrick et al., 1994). Nous reviendrons en détail sur les différents rôles attribués au couple Nétrine-1/Dcc dans l'intestin au cours du chapitre 3.

- **Caractéristiques structurales**

Récepteurs transmembranaires de type I, Dcc appartient à la superfamille des Immunoglobulines (Ig). D'environ 175-190 kDa (selon les isoformes), ce récepteur présente un long domaine N-terminal extracellulaire composé de quatre domaines Immunoglobulines (Ig) et de six domaines Fibronectines de type III (FNIII), ce qui lui vaut une forte homologie avec les molécules d'adhésion cellulaire neuronale (N-CAM). Son domaine intracellulaire, beaucoup plus court, ne présente aucune homologie avec une quelconque protéine connue à ce jour. Néanmoins celui-ci se compose de trois régions conservées, P1, P2 et P3, requises aux signalisations induites par ce récepteur **(Figure 15)**. C'est au niveau des 4ème et 5ème domaines fibronectine de type III que la Nétrine-1 interagit avec le récepteur Dcc (Bennett et al., 1997), (Geisbrecht et al., 2003), (Xu et al., 2014).

- **Signalisation induite par le couple Dcc/Nétrine-1**

Chez les vertébrés les voies de signalisations induites par la liaison de la Nétrine-1 à son récepteur Dcc ont principalement été étudiées et décrites dans les structures mobiles que constituent les cônes de croissance des axones. Au sein de ces structures la fixation d'une molécule de guidage axonal à son récepteur membranaire induit une cascade de signalisation intra-cytoplasmique qui conduit à la réorganisation du cytosquelette. Cette réorganisation permet de répondre à la fonction attractive ou répulsive de la molécule de guidage rencontrée en promouvant la croissance de l'axone dans la direction empruntée ou au contraire en rétractant l'axone, en orientant celui-ci vers une seconde cible,…

La fixation de la Nétrine-1 à Dcc induit la dimérisation de ce récepteur *via* son domaine intracellulaire P3, au niveau de micro-domaines membranaires favorisant la signalisation : les radeaux lipidiques. Ce changement conformationnel et cette localisation permettent ainsi à Dcc d'interagir avec de nombreuses protéines intracellulaires telles que la protéine adaptatrice Nck1 (non catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1), les protéines à activité tyrosine kinase FAK et Fyn, la protéine kinase sérine-thréonine Pak1 (p21-activating kinase 1), ainsi que les protéines de liaison à l'actine Ena/Vasp et N-WASP (neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein). Le recrutement de celles ci conduit alors à l'activation de plusieurs voies de signalisations, parmi lesquelles notamment : la voie des Rho GTPases impliquant Cdc42 et Rac1 et coordonnant la réorganisation du cytosquelette et les interactions adhésives ; la voie des seconds messagers faisant intervenir l'AMPc, l'GMPc et le calcium ; et celle des MAPKs au cours de laquelle les MAPK ERK1/2 sont phosphorylées (pour revues (Barallobre et al., 2005), (Karen Lai Wing Sun et al., 2011)).

2. Néogénine

Néogénine est le second homologue de Unc-40 identifié chez les vertébrés. Appartenant également à la superfamille des immunoglobulines, ce récepteur transmembranaire de type I partage 50% d'homologie avec Dcc et présente une structure secondaire similaire **(Figure 15)**. L'interaction Nétrine-1/Néogénine fut mise en évidence en même temps que celle Nétrine-1/Dcc (Keino-Masu et al., 1996). De façon similaire, celle-ci fait intervenir les domaines VI et V de la Nétrine-1 ainsi que les 4ème et 5ème domaines FNIII du récepteur. Bien que la liaison de la Nétrine-1 à Néogénine fasse intervenir les mêmes domaines que pour la liaison à Dcc, des différences stœchiométriques et structurelles de ces liaisons sont néanmoins observées (Xu et al., 2014).

Au cours du développement du SNC l'expression de Néogénine est principalement observée dans des régions dites de maturation neuronale dans lesquelles ont lieu des processus d'axogénèse et d'arborisation dendritique (Gad et al., 1997), (Fitzgerald et al., 2006). Néanmoins, le processus de guidage axonal attribué dans ces structures à Néogénine n'implique pas la molécule de guidage axonal Nétrine-1, mais la molécule Rgma (Repulsive Guidance Molecule a) autre ligand de Néogénine possédant une affinité plus de dix fois supérieure à celle de la Nétrine-1 (Rajagopalan et al., 2004). En plus des régions de maturation neuronale, le récepteur Néogénine est également présent dans des régions de neurogénèse (Gad et al., 1997), (Keeling et al., 1997), (Fitzgerald et al., 2006). Toutefois, de façon très surprenante les souris déficientes du gène *Néogénine* ne présentent aucun phénotype particulier au niveau du guidage axonal neuronal et sont parfaitement viables (Bae et al., 2009).
Contrairement à son homologue Dcc, dont l'expression est majoritairement restreinte au SNC, Néogenine est exprimé dans un très large spectre de tissus, tant lors du développement embryonnaire que chez l'adulte (Gad et al., 1997), (König et al., 2012). Nous aborderons certains d'entre eux au cours du paragraphe III.

3. La famille des récepteurs Unc5

Outre l'importance du gène *unc-6*, le crible génétique mené chez *C.elegans* par Hedgecock et *al.* en 1990 révéla également l'implication du gène *unc-5* dans la mise en place des projections axonales ventro-dorsales dans la moelle épinière. Ayant constaté que les défauts de projections axonales observés chez les mutants *unc-5* étaient également présents chez les mutants *unc-6*, Hedgecock et *al.* suggérèrent qu'Unc-5 soit un récepteur à Unc-6 et qu'il soit requis à la migration et la projection de certains types d'axones loin de la source de Unc-6. Ainsi, en plus de l'action attractive exercée par Unc-6 sur les projections axonales de neurones exprimant Unc-40 (Dcc), les auteurs mirent en évidence l'action répulsive exercée par cette même molécule sur les projections axonales de neurones exprimant Unc-5. Cette bifonctionnalité de Unc-6/Nétrine-1, conditionnée par la nature des récepteurs engagés, fut très rapidement confirmée par d'autres études, notamment chez les vertébrés (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995).

A ce jour quatre homologues à Unc5 ont été identifiés chez les vertébrés. Ceux-ci sont nommés Unc5-A, -B, -C, -D.

- **Profil d'expression**

Comme l'ensemble des récepteurs à la Nétrine-1, les récepteurs Unc5 sont particulièrement exprimés dans le SNC en développement, dans de nombreuses structures (Leonardo et al., 1997), (Barrett and Guthrie, 2001), (Zhong et al., 2004).

Si l'expression de Unc5-A semble restreinte au SNC, l'expression des récepteurs Unc5-B à -D est quant à elle rapportée dans divers tissus embryonnaires tels que dans la structure communément appelée « bourgeon des membres » par exemple (Engelkamp, 2002). Par ailleurs Unc5-B et –D sont respectivement présents au cours de la formation du système vasculaire et de la glande mammaire respectivement (Engelkamp, 2002).

Chez l'adulte, les récepteurs Unc5-A à C sont encore fortement exprimés au niveau de la moelle épinière (Manitt et al., 2004). A l'extérieur du SNC, l'expression de ces récepteurs et plus particulièrement de Unc5-B semble relativement ubiquitaire (Thiebault et al., 2003).

De façon intéressante, alors que l'invalidation des récepteurs Unc5-A et –D ne semble pas conduire à la mort des animaux mutants (Williams et al., 2006), (Zhu et al., 2013), celle de Unc5-B induit une létalité embryonnaire au stade de développement E12.5 (Lu et al., 2004) et celle de Unc5-C une létalité néo-natale dans les heures suivants la naissance (Burgess et al., 2006).

- **Caractéristiques structurales**

Les membres de la famille Unc5 sont des récepteurs transmembranaires de type I d'environ 110 kDa appartenant eux aussi à la superfamille des Immunoglobulines.

Leur partie N-terminale extracellulaire se compose de deux domaines Ig suivis de deux domaines Thrombospondines de type I (Tsp). Leur partie C-terminale intra-cytoplasmique comporte pour sa part trois domaines distincts: un domaine ZU-5 (Zona Occludens-1/Unc5 homology domain) homologue à celui retrouvé dans les protéines de jonctions serrées intercellulaires Zona Occludens-1 ; un domaine UPA (Unc-Pidd-Ankyrins), commun aux protéines Unc5, Pidd et Ankyrin, capable d'interagir avec le domaine intracytoplasmique P3 de Dcc, d'où son appellation alternative de domaine DB (Dcc binding) et enfin un domaine de mort DD (Death Domain), homologue à celui des récepteurs de mort de la famille des Tnf **(Figure 15)**. L'interaction Nétrine-1/Unc5 fait intervenir les domaines VI et V de la Nétrine-1 ainsi que les deux domaines Ig des récepteurs Unc5 (Geisbrecht et al., 2003), (Kruger et al., 2004), (Grandin et al., 2016).

- **Signalisation induite par le couple Nétrine-1/Unc5**

Les mécanismes intracellulaires conduisant à une action répulsive de la Nétrine-1 sont aujourd'hui bien moins décrits et compris que ne le sont ceux conduisant à une action attractive impliquant le récepteur Dcc. L'une des rares protéines ayant été identifiée est la tyrosine phosphatase Shp2 dont le recrutement nécessite la phosphorylation des domaines ZU-5 des récepteurs Unc5. Cette phosphorylation est induite lors de l'homodimérisation des Unc5 ou lors de l'hétérodimérisation de Unc5 et de Dcc, faisant suite à la fixation de la Nétrine-1. Au niveau des récepteurs Unc5 la protéine Shp2 interagirait avec des protéines Rho GTPases et stimulerait la réorganisation du cytosquelette (Tong et al., 2001).

B. Autres récepteurs à la Nétrine-1

1. Dscam

De façon similaire à Dcc, le récepteur Dscam (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) est exprimé par les axones des neurones commissuraux de la moelle épinière et semble participer au guidage de ceux-ci en réponse à la Nétrine-1 (Ly et al., 2008), (Liu et al., 2009). Ce récepteur, capable de lier la Nétrine-1 (Andrews et al., 2008), est un récepteur transmembranaire de type I appartenant également à la famille des Immunoglobulines. En effet, son domaine N-terminal extracellulaire présente dix domaines Immunoglobulines suivis de six domaines fibronectine de type III. Son domaine C-terminal intracellulaire ne présente pour sa part pas d'homologie particulière connue (Yamakawa et al., 1998), **(Figure 15)**.

Bien que ce récepteur soit capable d'interagir avec la Nétrine-1, son implication dans la croissance et le guidage des axones commissuraux fut remise en question par l'analyse du modèle murin de délétion du gène *Dscam*. En effet, chez ces souris, la perte d'expression de Dscam ne révéla aucun défaut d'élongation ni de guidage des neurones commissuraux (Palmesino et al., 2012). Cette déficience pour le gène *Dscam* induit néanmoins une létalité néo-natale dans les 24h suivant leur naissance, résultant d'une insuffisance respiratoire due à une perte d'activité des neurones « pré-inspiratoires» (Amano et al., 2009).

Au cours du développement embryonnaire des vertébrés, Dscam est exprimé dans la plupart des régions du SNC (Yamakawa et al., 1998). En dehors de ce système, son

expression est beaucoup plus rare. Celle-ci est toutefois rapportée dans le placenta ainsi que dans des structures en formation dérivant des crêtes neurales en migration, telles que les ganglions pancréatiques et le système nerveux entérique (Yamakawa et al., 1998). Ainsi, certains patients atteints du syndrome de Down (présentant une copie surnuméraire du gène *DSCAM* liée à une trisomie 21) sont également touchés par la maladie de Hirschsprung. Cette maladie, résultant d'une incapacité des crêtes neurales à coloniser une partie ou la totalité du colon, se caractérise par une absence de plexus nerveux entériques conduisant à une contraction permanente des muscles digestifs.

Chez l'adulte, l'expression de Dscam est conservée dans de nombreuses zones du SNC. A l'inverse, les tissus dérivés des crêtes neurales ne semblent plus exprimer ce récepteur une fois leur morphogénèse et maturation terminées (Yamakawa et al., 1998).

2. Les intégrines α6β4 et α3β1

Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires composés d'une sous unité α et d'une sous unité β dont la masse moléculaire varie entre 200 et 300 kDa (Hynes, 1992), **(Figure 15)**. Capables de se lier aux molécules de la matrice extracellulaire (MEC) *via* leur domaine extracellulaire et d'activer des voies de transduction intracellulaire faisant intervenir des protéines kinases, les intégrines sont impliquées dans l'adhésion cellulaire, la migration et/ou la prolifération. Aujourd'hui plus de dix huit hétérodimères différents ont été répertoriés. Ceux-ci sont observés à travers l'ensemble des tissus et la plupart des cellules expriment à leur surface plusieurs d'entre eux. L'existence d'une interaction entre la Nétrine-1 et les hétérodimères α6β4 et α3β1 fut mise en évidence par Yebra et *al.* en 2003 lors d'une étude portant sur le développement embryonnaire de l'épithélium pancréatique (Yebra et al., 2003). Contrairement aux interactions classiquement observées pour la Nétrine-1 et ses récepteurs, la liaison avec les intégrines α6β4 et α3β1 ferait intervenir le domaine C terminal de la Nétrine-1.

3. A2b

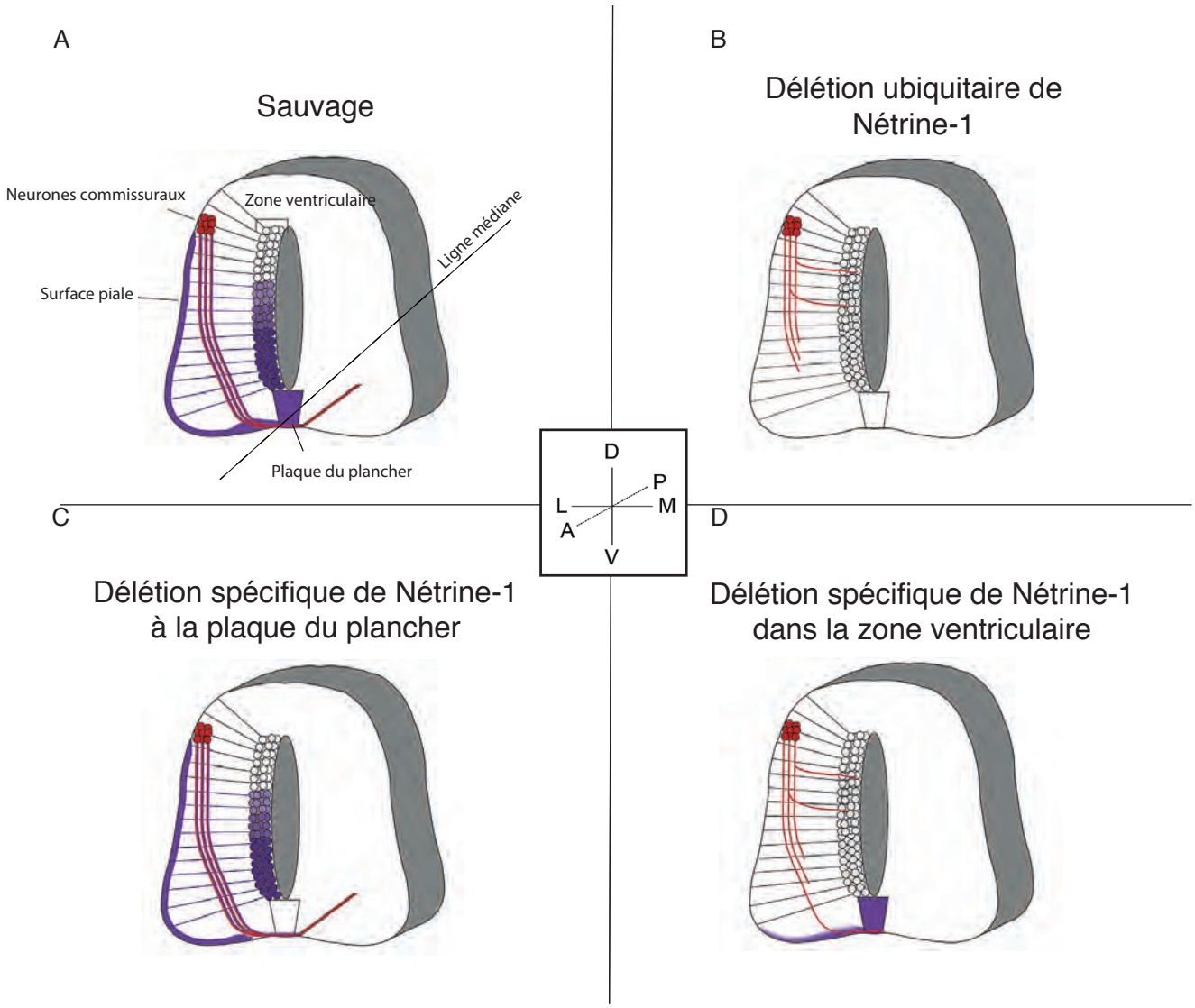
A2b (Adenosine 2b receptor) appartient à la famille des récepteurs à adénosine dont la fonction consiste à moduler le taux d'AMPc (Adnosine MonoPhosphate cyclique) intracellulaire, second messager crucial au cours du guidage axonal (Feoktistov and Biaggioni, 1997), **(Figure 15)**. D'après une étude publiée en 2000, A2b serait un partenaire de Dcc capable de lier la Nétrine-1. Toujours d'après cette étude, la formation du complexe

Nétrine-1/A2b/Dcc stimulerait la production d'AMPc et de ce fait la croissance axonale (Corset et al., 2000). Toutefois cette étude est controversée. En effet plusieurs études publiées postérieurement récusent soit la nécessité de l'activation d'A2b par la Nétrine-1 à la croissance et au guidage axonal (Stein et al., 2001), soit l'interaction directe entre A2b et la Nétrine-1 (McKenna et al., 2008).

4. App

App (β-Amyloid precursor protein) est un récepteur orphelin majoritairement connu pour son implication dans la maladie neuro-dégénérative incurable d'Alzheimer. Chez les patients atteints de cette maladie, les clivages protéolytiques du récepteur App par des sécrétases conduisent à la génération de peptides amyloïdes-β. L'accumulation de ceux-ci sous forme de dépôts extracellulaires appelés plaques séniles ou plaques amyloïdes-β constitue l'une des caractéristiques majeures de la maladie d'Alzheimer.

En conditions physiologiques et en présence de Nétrine-1, App interagit avec le récepteur Dcc afin d'amplifier la signalisation intracellulaire de ce dernier. Dans la moelle épinière en développement par exemple, App agit ainsi comme co-récepteur à Dcc et participe à la croissance et au guidage des axones commissuraux, en réponse à la Nétrine-1. L'inactivation de ce récepteur chez les mutants App se caractérise par une réduction de la croissance axonale des neurones commissuraux (Rama et al., 2012). De façon intéressante, la sur-expression de Nétrine-1 ou l'administration de Nétrine-1 à des souris, réduit la production de peptide amyloïdes-β. Ainsi, *via* son interaction avec App, la Nétrine-1 constitue un régulateur négatif de la formation des plaques séniles dans le cerveau (Lourenço et al., 2009).



<u>Figure 16:</u> Guidage axonal des neurones commissuraux à la ligne médiane par la Nétrine-1.

Adapté de Hand and Kolodkin, 2017.

A. Dans les conditions physiologiques, les neurones commissuraux situés dans la partie dorsale de la moelle épinière projettent leurs axones en direction ventrale, traversent la ligne médiane au niveau de la plaque du plancher, puis se réorientent pour projeter longitudinalement selon l'axe antéro-postérieur de la moelle épinière.

B. En absence totale de Nétrine-1 (en violet) les axones des neurones commissuraux projettent de façon aberrante. N'étant plus guidés en direction ventrale, ils n'atteignent plus la plaque du plancher et ne traversent plus la ligne médiane.

C. La perte d'expression de la Nétrine-1 spécifiquement à la plaque du plancher n'altère nullement la capacité des axones des neurones commissuraux à projeter en direction de la plaque du plancher et à traverser la ligne médiane.

D. La perte d'expression de la Nétrine-1 spécifiquement dans les progéniteurs neuronaux situés dans la zone ventriculaire suffit à empêcher les neurones commissuraux de projeter leurs axones en direction ventrale. Ces derniers qui ne sont plus guidés jusqu'à la ligne médiane ne la traversent plus.

III. Rôles fonctionnels de la Nétrine-1 et de ses récepteurs

A. Dans le système nerveux central : une molécule de guidage axonal et de migration neuronale.

Au cours du développement embryonnaire la Nétrine-1 et ses récepteurs sont fortement exprimés dans de multiples régions du système nerveux central (SNC). La littérature qui s'y réfère étant très dense nous ne citerons dans ce manuscrit que quelques exemples permettant d'illustrer le rôle de cette molécule dans le guidage axonal et la migration neuronale.

- **La Nétrine-1 : une molécule de guidage axonal**

Dans la moelle épinière en développement, la Nétrine-1 est particulièrement exprimée au niveau d'une structure ventrale et médiane appelée plaque du plancher, ainsi qu'au niveau des progéniteurs neuronaux, dont les corps cellulaires se situent dans les deux tiers ventraux de la zone ventriculaire et dont les prolongements radiaux contactent la surface du système nerveux : la surface piale (Serafini et al., 1996), **(Figure 16A)**. Comme nous l'avons déjà abordé, la Nétrine-1 joue, au sein de ce tissu, un rôle primordial dans l'établissement des projections dorso-ventrales des axones commissuraux en guidant ces derniers de la région dorsale jusqu'à la région ventrale de la plaque du plancher où ils traversent la ligne médiane. Lors de ce processus, les axones commissuraux sont tout d'abord projetés à proximité de la surface piale puis guidés jusqu'à la colonne motrice (en position ventro-latérale). En cette position ces axones opèrent alors un changement de direction leur permettant de s'éloigner de la surface piale et de progresser en direction de la plaque du plancher pour franchir la ligne médiane. Passés cette dernière, les axones des neurones commissuraux se réorientent à nouveau et projettent longitudinalement vers l'avant ou l'arrière de la moelle épinière (Wentworth, 1984), **(Figure 16A)**. Dans ce contexte la Nétrine-1 joue donc un rôle de **molécule chimio-attractive** en guidant les axones des neurones commissuraux, exprimant à leur surface le récepteur Dcc (Keino-Masu et al., 1996), vers la plaque du plancher. Ainsi, les animaux déficients pour le gène *Nétrine-1* présentent des défauts majeurs de croissance axonale et de projections des axones commissuraux (Serafini et al., 1996), (Dominici et al., 2017), (Varadarajan et al., 2017), également observés chez les animaux invalidés de façon constitutive pour le gène *Dcc* (Fazeli et al., 1997). En absence du ligand Nétrine-1 ou du récepteur Dcc, les axones commissuraux

ne perçoivent donc plus les signaux attractifs médiés par la Nétrine-1 et ne sont donc plus guidés à la plaque du plancher. Ceux-ci sont alors incapables de traverser la ligne médiane, et projettent de façon aberrante (Dominici et al., 2017), (Varadarajan et al., 2017), **(Figure 16B)**.

Pendant très longtemps il fut tenu pour postulat que la Nétrine-1 sécrétée par la plaque du plancher était capable de diffuser sur une longue distance et d'établir un gradient attirant les neurones commissuraux à la ligne médiane. Deux études parues cette année remirent en question ce dogme (Dominici et al., 2017), (Varadarajan et al., 2017). En effet grâce à la génération de différents modèles murins de délétion conditionnelle de la Nétrine-1, il fut montré que la délétion de celle-ci spécifiquement à la plaque du plancher ne conduit à aucun défaut de guidage axonal des neurones commissuraux **(Figure 16C)**. À l'inverse la délétion spécifique de la Nétrine-1 dans les progéniteurs neuronaux de la zone ventriculaire diminue de façon drastique le nombre d'axones commissuraux atteignant la plaque du plancher et traversant la ligne médiane **(Figure 16D)**. Les projections ventrales des axones commissuraux semblent donc répondre à la Nétrine-1 produite par les progéniteurs neuronaux et transportée par leurs prolongements jusqu'à la surface piale où elle s'accumule, plutôt qu'à un gradient ventro-dorsal de Nétrine-1 diffusant à partir de la plaque du plancher (Dominici et al., 2017). La Nétrine-1 agirait donc dans ce contexte comme **une molécule de guidage haptotactique de courte distance** plutôt que comme une molécule chimio-attractive diffusible sur une longue distance.

Tout comme les molécules de guidage axonal Ephrine, la Nétrine-1 est **une molécule bifonctionnelle**. En effet, outre son **action attractive** exercée sur les axones des neurones commissuraux exprimant le récepteur Dcc, la Nétrine-1 exerce également **un rôle répulsif** sur certains types de neurones exprimant des récepteurs Unc5.
À titre d'exemple, dans le tronc cérébral en développement, les motoneurones trochléaires projettent leurs axones de façon dorsale, loin de leurs corps cellulaires localisés en position ventrale, afin d'innerver les muscles extra-oculaires des yeux. Ces projections ventro-dorsales résultent de la présence de Nétrine-1 à la plaque du plancher qui, par son interaction avec les récepteurs Unc5 exprimés à la surface des axones trochléaires, exerce une action répulsive (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995), (Varela-Echavarría et al., 1997). Cette action répulsive du couple Nétrine-1/Unc5 serait une **action à courte distance**. L'action chimio-répulsive de la Nétrine-1 à **longue distance** nécessiterait, en plus des récepteurs Unc5, la présence du récepteur Dcc (Hong et al., 1999). En effet, la simple formation d'hétérocomplexes Dcc/Unc5 *via* leurs domaines intra-cytoplasmiques respectifs P3 et UPA/DB suffit à convertir l'attraction attractive médiée par Dcc en réponse à la

Nétrine-1 en répulsion (Hong et al., 1999). Dans le SNC de nombreux neurones co-expriment ces deux récepteurs. L'effet attractif ou répulsif de la molécule de guidage axonal Nétrine-1 est donc conditionné par la nature de ses récepteurs impliqués.

Dans la moelle épinière, le fort niveau d'expression de Nétrine-1 à la ligne médiane est observé jusqu'à ce que les neurones commissuraux aient atteints et traversés celle-ci. Par la suite cette expression diminue progressivement jusqu'à devenir indétectable à la naissance. Chez l'adulte, la Nétrine-1 n'est plus détectée à la ligne médiane de la moelle épinière et son expression est fortement réduite dans de nombreuses autres régions du SNC (Livesey and Hunt, 1997).

- **La Nétrine-1 : une molécule de migration neuronale**

Tout comme le guidage axonal, la migration neuronale est un processus essentiel au développement du SNC. En effet, ce processus est indispensable à la bonne localisation des différents types neuronaux et de ce fait à l'établissement d'un circuit neuronal fonctionnel. Produits au niveau de la zone ventriculaire, les neurones post-mitotiques migrent en direction de leur site définitif selon deux types de déplacements : la migration radiale, pendant laquelle les neurones se déplacent le long des fibres gliales s'étendant de la zone ventriculaire à la surface piale; ou la migration tangentielle, au cours de laquelle les neurones se déplacent selon un axe perpendiculaire au réseau de fibres gliales sans guide matériel mais sous le contrôle de signaux attractifs ou répulsifs. La Nétrine-1 constitue l'un de ces signaux. En effet, à titre d'exemple, il fut montré que l'interaction Nétrine-1/Dcc est impliquée dans la migration de certains interneurones dorsaux de la moelle épinière (Junge et al., 2016). Au cours d'une étude réalisée en 2009, il fut également montré que l'interaction Nétrine-1/Intégrine α3β1 est requise à la migration tangentielle des interneurones corticaux de leur lieu de production vers le cortex (Stanco et al., 2009). Les souris invalidées pour le gène *Nétrine-1* présentent ainsi plusieurs défauts de migration neuronale et n'ont par exemple plus de noyaux pontins, responsables des connexions entre les hémisphères cérébraux et le cervelet (Serafini et al., 1996), (Yee et al., 1999). De façon similaire au guidage axonal, la Nétrine-1 se révèle être **une molécule de migration neuronale bifonctionnelle**, pouvant exercer **un effet attractif ou répulsif** sur les neurones en migration, en fonction du ou de récepteurs engagés (Yee et al., 1999a), (Alcántara et al., 2000), (Guijarro et al., 2006).

C. Dans le système nerveux périphérique : une molécule de guidage axonal et de migration neuronale.

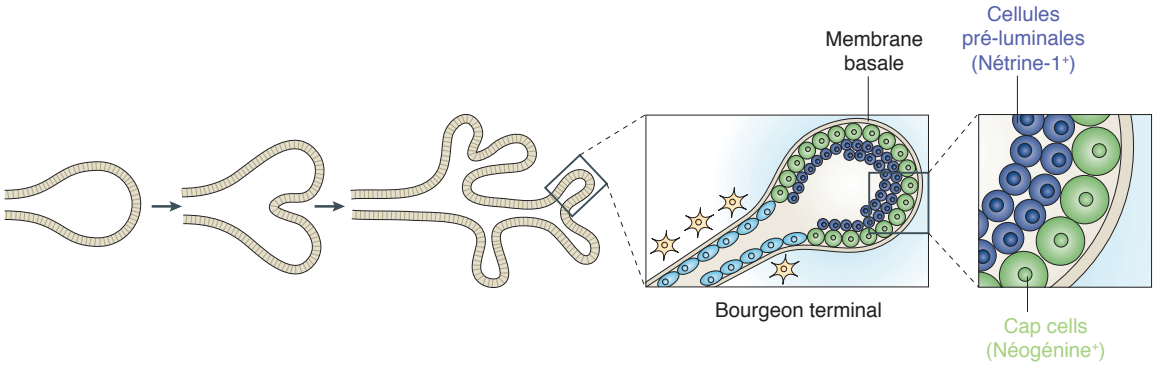
Au delà de son rôle primordial dans la mise en place du SNC, la Nétrine-1 est impliquée dans la mise en place de certaines structures du système nerveux périphérique (SNP). Par exemple lors du développement du système nerveux entérique, la Nétrine-1, exprimée au niveau des couches les plus externes du mésenchyme intestinal ainsi qu'à la base de l'épithélium intestinal contribue à l'attraction et au guidage des cellules dérivées des crêtes neurales jusqu'à l'emplacement du futur plexus sous muqueux. L'effet **chimio-attractif à longue distance** exercé par la Nétrine-1 dans ce contexte fait intervenir le récepteur Dcc, exprimé à la surface des crêtes neuronales et précurseurs neuronaux (Jiang et al., 2003).

Nous avons vu précédemment qu'au cours du développement embryonnaire le récepteur Dscam est également exprimé dans des structures en formation dérivant des crêtes neurales en migration, telles que les ganglions pancréatiques et le système nerveux entérique (Yamakawa et al., 1998). Toutefois, le rôle de Dscam dans la migration des crêtes neurales, leur différenciation et/ou leur colonisation de certains organes en formation ainsi que son interaction avec la Nétrine-1 dans ce contexte reste à approfondir.

D. En dehors du système nerveux : une molécule pléïotropique

En dehors des systèmes nerveux central et périphérique la Nétrine-1 est exprimée dans divers tissus au sein desquels ses fonctions se révèlent variées, parfois même controversées, mais surtout dépendantes des récepteurs et interactions engagés.

Au cours du développement embryonnaire, la Nétrine-1 intervient ainsi dans la **morphogénèse** de plusieurs organes. Par exemple, le couple Nétrine-1/Unc5-B régulerait la morphogénèse pulmonaire en inhibant la formation de bourgeons pulmonaires ectopiques et en contrôlant la taille et la forme de ceux émergeant (Liu et al., 2004). Dans l'oreille interne, l'expression de la Nétrine-1 au niveau de l'épithélium otique est requise à la formation des canaux semi-circulaires (Salminen et al., 2000). Dans ce dernier contexte, sa fonction ferait intervenir les intégrines α3β1 et potentiellement des composants de la matrice extracellulaire (Matilainen et al., 2007).



<u>Figure 17 :</u> Implication du couple Nétrine-1/Néogénine au cours de la morphogénèse de la glande mammaire.

Au cours de la puberté, la croissance du réseau cannalaire mammaire fait intervenir une structure spécialisée à l'extrémité des canaux en élongation : le bourgeon terminal. Cette structure est composée de deux couches cellulaires étroitement associées : la couche de cellules épithéliales préluminales qui bordent la lumière interne et les « cap cells », progéniteurs multipotents formant une monocouche de cellules en contact avec la matrice extracellulaire. La cohésion entre ces deux assises cellulaires, essentielle au maintien du bourgeon terminal en cours d'élongation, est assurée par l'interaction entre la Nétrine-1, exprimée par les cellules pré-luminales, et son récepteur Néogénine, exprimé par les « cap cells ».
Issu de Cirulli and Yebra, 2007.

Au cours de la morphogénèse de la glande mammaire, le couple Nétrine-1/Néogénine joue un rôle primordial dans **l'adhésion cellulaire**. Ce couple contribue en effet à l'association étroite de deux couches cellulaires distinctes : la couche de cellules préluminales du bourgeon terminal exprimant la Nétrine-1 et la couche adjacente de progéniteurs multipotents (les « cap cells ») exprimant le récepteur Néogénine (Srinivasan et al., 2003) **(Figure 17)**. Dans un autre contexte, le couple Nétrine-1/Néogénine est capable, *in vitro*, de promouvoir **la migration et l'adhésion des cellules** musculaires lisses vasculaires (Park et al., 2004).

Le rôle de la Nétrine-1 dans **la migration et l'adhésion cellulaire** est également observé lors du développement embryonnaire du pancréas. En effet, au cours de celui-ci les cellules de l'épithélium pancréatique exprimant les intégrines α6β4 et α3β1 migrent en direction des cellules produisant et sécrétant la Nétrine-1 puis adhèrent à cette molécule au niveau des lames basales où elle est déposée et séquestrée par d'autres composants de la MEC (Yebra et al., 2003).

Récemment, il fut révélé qu'*in vitro* l'interaction Nétrine-1/Intégrine α6β4 semble capable de **réguler la prolifération** de cellules souches mésenchymateuses de cordon ombilical humain (Sang Lee et al., 2016). *In vivo*, dans le rein adulte la Nétrine-1 présente aussi des **propriétés proliferatives**, mais *via* son récepteur Unc5-B cette fois (Wang et al., 2009).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études se sont également intéressées au rôle potentiel de la Nétrine-1 dans les processus d'**angiogénèse** et de **vasculogénèse**. En effet, en dehors du SNC, le récepteur UNC5-B est particulièrement exprimé par les cellules endothéliales appelées « tip cells », localisées aux extrémités des capillaires sanguins en croissance (Lu et al., 2004), (Larrivée et al., 2007). De façon similaire aux cônes de croissance des axones, les « tip cells » ont pour rôle de sonder l'environnement, d'intégrer les signaux de guidage rencontrés, et d'orienter la croissance des vaisseaux en réponse à ceux-ci. A l'instar du rôle joué par le couple Nétrine-1/Unc5-B dans le système nerveux en développement, il fut suggéré que ce couple puisse également être impliqué dans la mise en place du réseau vasculaire. De plus, chez la souris, l'invalidation du gène *Unc5-B* engendre une létalité embryonnaire au stade E12.5 résultant de branchements vasculaires ectopiques ainsi que d'une augmentation du nombre d'extensions filopodiales au niveau des tip cells (Lu et al., 2004).

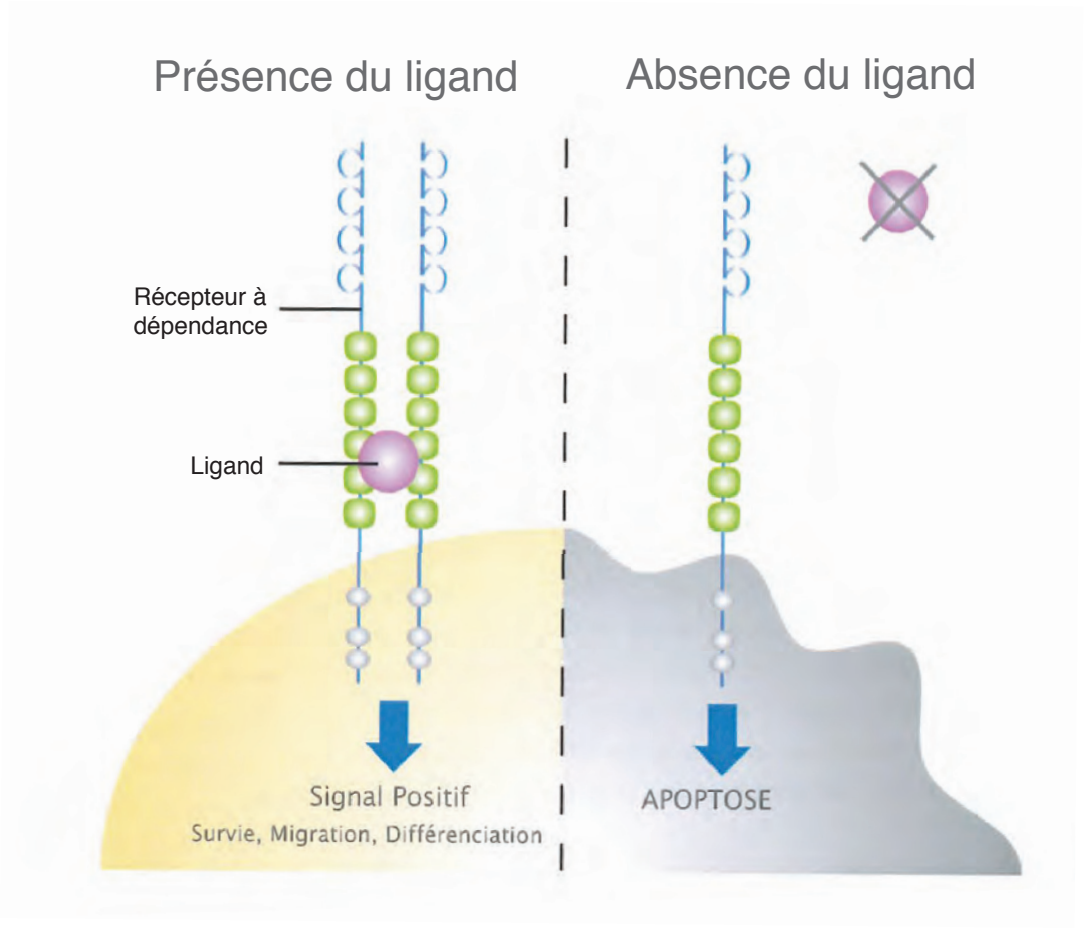
Certaines équipes ont ainsi mis en évidence **un rôle anti-angiogénique** de ce couple (Lu et al., 2004), (Larrivée et al., 2007), (Bouvrée et al., 2008). Toutefois, d'autres suggèrent, à

l'inverse, **un rôle pro-angiogénique** de celui-ci (Park et al., 2004), (Castets et al., 2009). Notons qu'*in vivo* la source de Nétrine-1 au niveau du système vasculaire est inconnue et que les souris déficientes du gène *Nétrine-1* ne semblent présenter aucun défaut de ce système, contrairement aux mutants *Unc5-B*. De plus l'interaction du récepteur Unc5-B avec le récepteur Robo4 (Roundabout 4) s'est avérée conduire à une inhibition de la voie Vegf, fortement impliquée dans l'angiogénèse (Koch et al., 2011). Cette activité anti-angiogénique de Unc5-B indépendante de Nétrine-1 concorde avec le phénotype des souris déficientes pour Unc5-B. A ce jour, le rôle de la Nétrine-1 dans l'angiogenèse reste donc controversé et à élucider.

Outre, les organes et systèmes abordés ci-dessus la Nétrine-1 et certains de ses récepteurs sont exprimés de façon concomitante dans plusieurs autres tissus. Néanmoins, le(s) rôle(s) joués par ceux-ci sont encore aujourd'hui incompris. Ainsi, la Nétrine-1 est par exemple exprimée dans le placenta (Dakouane-Giudicelli et al., 2010), (Dakouane-Giudicelli et al., 2014), organe au sein duquel le récepteur Dscam est également présent (Yamakawa et al., 1998). Cependant, aucune étude ne renseigne un rôle potentiel du couple Dscam/Nétrine-1 dans la mise en place ou le maintien structurel de cet organe. De façon similaire, lors du développement des membres, l'expression des récepteurs Dcc, Unc5-B à –D est observée dans la structure des « bourgeons des membres », au sein de laquelle la Nétrine-1 est également présente. Dans cette structure les récepteurs Unc5-B, -C et -D ainsi que Dcc présentent des profils d'expression spatio-temporel uniques et exclusifs, aucune co-expression n'ayant été mise en évidence (Engelkamp, 2002). Aujourd'hui le(s) rôle(s) potentiel(s) joué(s) par la Nétrine-1 et ses récepteurs dans les bourgeons des membres restent à approfondir.

E. La Nétrine-1 une molécule de survie *via* ses récepteurs à dépendance

En 1998, lors d'une étude menée *in vitro* impliquant le couple Nétrine-1/Dcc, Patrick Mehlen proposa un nouveau concept concernant le mode de fonctionnement de certains récepteurs. Par opposition aux récepteurs « classiques », inactifs en absence de leurs ligands, certains récepteurs possèderaient la capacité d'induire deux signalisations antagonistes dépendantes de la disponibilité de leurs ligands dans le milieu. Ainsi, en présence de leurs ligands ces récepteurs induiraient des signaux de migration cellulaire, d'adhésion cellulaire, de prolifération et/ou de différenciation. À l'inverse, en absence de leurs ligands, ces



<u>Figure 18:</u> Le concept des récepteurs à dépendance

Représentation schématique du concept des récepteurs à dépendance.
Les récepteurs à dépendance se caractérisent par leur dualité de fonction. En présence de leur ligand ceux-ci induisent une signalisation positive permettant de promouvoir la survie cellulaire, la migration, la prolifération, l'adhésion cellulaire et/ou la différenciation. En absence de leur ligand ils induisent une signalisation pro-apoptotique conduisant à la mort des cellules qui les expriment.

récepteurs induiraient activement l'apoptose des cellules qui les expriment. Ces signalisations sont respectivement appelées « voie positive » ou de survie et « voie négative » ou pro-apoptotique. Ces récepteurs sont regroupés sous le terme de récepteurs à dépendance (RD) puisque les cellules qui les expriment apparaissent dépendantes pour leur survie de la présence de ligands (Mehlen et al., 1998), **(Figure 18)**.

Aujourd'hui la famille des récepteurs à dépendance est une famille fonctionnelle composée de plus d'une vingtaine de membres, tous différents en terme de structure. En plus du récepteur Dcc, qui fit émerger le concept (Mehlen et al., 1998), la famille des récepteurs à dépendance compte d'autres récepteurs à la Nétrine-1 tels les récepteurs Unc5 (Llambi et al., 2001) et Néogénine (Matsunaga et al., 2004). Notons toutefois que Néogénine fut montré comme récepteur à dépendance vis-à-vis de son ligand Rgm et non vis-à-vis de la Nétrine-1. En effet la voie pro-apoptotique induite par celui-ci ne peut être bloquée que par la liaison au ligand Rgm (Matsunaga et al., 2004).
En plus de leur dualité de fonction, les récepteurs à dépendance possèdent la particularité d'être impliqués lors du développement embryonnaire ainsi que lors des processus de tumorigénèse.

- **Les récepteurs à dépendance au cours du développement embryonnaire**

Une hypothèse émise par le laboratoire propose qu'au cours du développement embryonnaire, les RD permettraient de contrôler le nombre de cellules au sein d'une structure définie, ainsi que leur territorialisation. Par exemple, au cours du développement du SNC, ces récepteurs réguleraient la prolifération et différenciation des progéniteurs neuronaux, et délimiteraient les régions de migration des neurones et de leurs projections axonales. Ainsi, les cellules colonisant les zones dépourvues de ligand seraient éliminées par apoptose. En accord avec cette théorie, une diminution du nombre de neurones olivaires et pontins fut décrite dans les souris déficientes pour le gène *Nétrine-1* (Bloch-Gallego et al., 1999), (Yee et al., 1999b). Néanmoins, ces résultats n'ont pu être corroborés lors d'études plus récentes également réalisées chez des souris déficientes du gène *Nétrine-1* (Bin et al., 2015), (Yung et al., 2015). Le rôle de ces récepteurs dans le développement embryonnaire reste donc à être approfondis et élucidé *in vivo*.

- **Les récepteurs à dépendance au cours de la tumorigénèse**

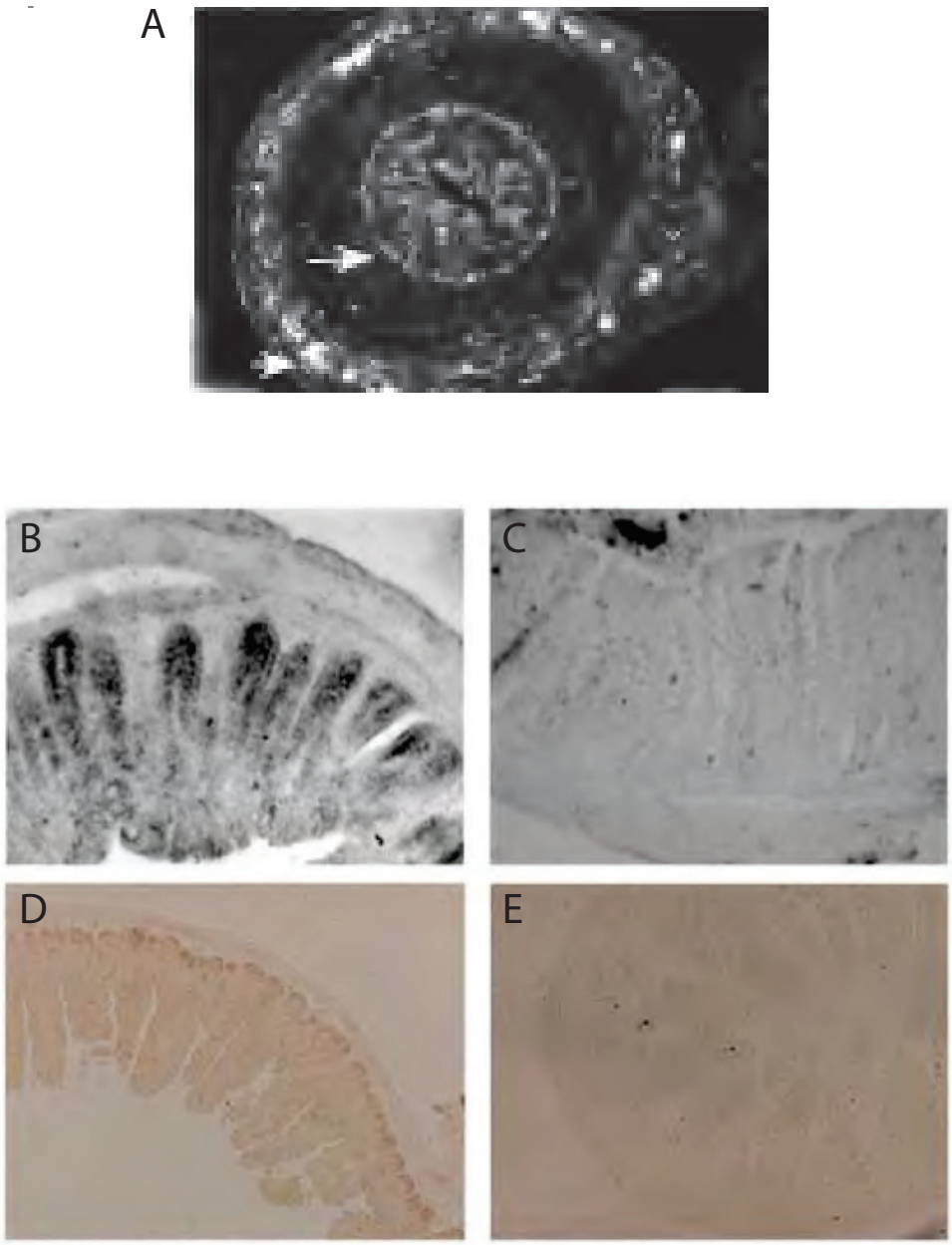
De part leur dualité de fonction les RD permettraient de maintenir l'homéostasie tissulaire tout en constituant un mécanisme de surveillance anti-tumorale. En effet *via* leur signalisation négative ces récepteurs participeraient à l'élimination des cellules proliférant de façon aberrante dans un environnement au sein duquel la quantité de ligand est limitante. Les RD sont donc généralement considérés comme des suppresseurs de tumeurs. Néanmoins, afin d'échapper à cette mort cellulaire induite, les cellules tumorales peuvent acquérir plusieurs mécanismes:

- la perte d'expression du RD, engendrant donc la perte de la signalisation pro-apoptotique.
- l'augmentation d'expression autocrine ou paracrine du ligand, bloquant ainsi la signalisation pro-apoptotique.
- la perte d'expression d'un ou plusieurs partenaires pro-apoptotique du récepteur.

En accord avec ces mécanismes d'échappement à la mort induite par les RD, la surexpression de Nétrine-1 a ainsi été rapportée dans un large spectre de types tumoraux tels que dans certains cancers du sein, de la prostate, du poumon, du pancréas, dans certains glioblastomes, neuroblastomes, dans des cancers gastriques et colorectaux, ...(Fitamant et al., 2008), (Latil et al., 2003), (Delloye-Bourgeois et al., 2009), (pour revues (Bernet and Fitamant, 2008), (Delcros and Mehlen, 2013), (Kefeli et al., 2017).

À l'inverse l'expression des récepteurs à la Nétrine-1, tels que Dcc et Unc5-B, est perdue dans de nombreux cancers tels que les cancers colorectaux, de la prostate, du sein ou de l'ovaire (Fearon et al., 1990), (Bernet et al., 2007), (Thiebault et al., 2003).

Nous venons de voir que la Nétrine-1, molécule initialement décrite comme molécule de guidage axonal, est aujourd'hui considérée comme une molécule pléiotropique. Indispensable au développement du système nerveux, la Nétrine-1 est également requise à la morphogénèse, et au maintien homéostatique de nombreux autres tissus et organes. Celle-ci apparaît ainsi impliquée dans des processus aussi variés que la migration et l'adhésion cellulaire, la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogénèse par exemple. La diversité de ses fonctions semble résulter notamment de la diversité de ses récepteurs et de leurs profils d'expression spatio-temporels.



<u>Figure 19:</u> Profil d'expression de la Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire et adulte.

A. Immunohistochimie anti-Nétrine-1 sur intestin grêle de souris à E13.
Au stade de développement embryonnaire E13 la Nétrine-1 est exprimée dans l'intestin grêle dans les couches les plus externes du mésenchyme, ainsi qu'à la base de l'épithélium. (Jiang et al., 2003)

B-C-Hybridation *in situ* anti-Nétrine-1 sur colon de souris adulte.
Sonde antisens (B) et sonde sens (C). (Mazelin et al., 2004)

D-E-Immunohistochimie anti-Nétrine-1 sur intestin grêle de souris adulte.
Avec l'anticorps primaire anti-Nétrine-1 (D) et sans anticorps primaire (D). (Mazelin et al., 2004).
Chez l'adulte la Nétrine-1 est exprimée dans l'épithélium intestinal, à la base des cryptes.

CHAPITRE 4 : NETRINE-1 ET INTESTIN

L'expression de la Nétrine-1 est observée dans l'intestin des mammifères au cours du développement embryonnaire mais également chez l'adulte. Nous allons revenir ici sur les études l'ayant décrite dans ce tissu et sur les rôles potentiels qui lui sont attribués.

I. Nétrine-1/Dcc, un couple requis à la formation des plexi sous muqueux du système nerveux entérique.

Chez la souris, l'expression de la Nétrine-1 est détectée dans l'intestin foetal dès le stade embryonnaire E11 et perdure aux stades prénataux. Au stade de développement E13 son expression semble localisée au niveau des couches les plus externes du mésenchyme intestinal ainsi qu'à la base de l'épithélium, sites présumés des plexi myentériques et sous muqueux respectivement (Jiang et al., 2003), **(Figure 19A)**. L'expression de Dcc ayant été rapportée dans l'intestin foetal au niveau des crêtes neurales en migration, puis au niveau des précurseurs neuronaux qui en dérivent (Reale et al., 1994), (Seaman et al., 2001), il fut suggéré que le couple Nétrine-1/Dcc soit impliqué dans la mise en place du système nerveux entérique (SNE). Dans ce contexte, la Nétrine-1 exercerait un effet chimio-attractif, *via* son récepteur Dcc, sur les crêtes neurales et précurseurs neuronaux en migration afin de les guider au niveau des futurs plexus myentériques et sous muqueux. Cette hypothèse fut testée et corroborée en partie par Jiang et *al.* lors d'une étude réalisée en 2003. Au cours de celle-ci les auteurs montrèrent qu'*ex vivo* les cellules dérivées des crêtes neurales d'intestin sont attirées par les sources de Nétrine-1 selon une signalisation Dcc dépendante. Le traitement de ces co-cultures par un anticorps anti-Dcc suffit à abolir cette attraction et à entraver la migration de ces cellules. De plus, l'étude des animaux délétés du gène *Dcc* révéla une absence de ganglions sous muqueux au niveau de l'intestin grêle. Les ganglions myentériques extérieurs ne sont néanmoins pas altérés par cette perte d'expression. (Jiang et al., 2003). Suite à ces observations il fut proposé que seule une sous population de cellules

dérivées des crêtes neurales expriment Dcc. Cette sous-population participerait à la formation des plexi sous muqueux et non à celle des plexi myentériques (Jiang et al., 2003). Il apparaît également évident que la colonisation de l'intestin par les cellules dérivées des crêtes neurales ne soit pas exclusivement dépendante du couple Nétrine-1/Dcc.

L'analyse de mutants *Ret,* dépourvus de tout système nerveux entérique (pour revue Avetisyan et al., 2015), révéla la nature non neuronale des sources de Nétrine-1 observées au niveau des plexi entériques. En effet chez ces animaux l'expression mésenchymateuse et épithéliale de la Nétrine-1 n'est pas altérée et la quantité totale de cette protéine n'est pas abaissée (Ratcliffe et al., 2011).

Au cours de leur étude publiée 2003 Jiang et al. montrèrent que chez la souris l'expression de Dcc est maximale entre les stades E13 et E15, stades pendant lesquels ont lieu la mise en place du système nerveux entérique et la formation des plexi. Suite la formation des plexi cette expression semble décroître drastiquement jusqu'à atteindre un niveau quasiment indétectable à la naissance alors que l'expression de la Nétrine-1 est quant à elle maintenue. L'expression quasi nulle de Dcc dans l'intestin en dehors des cellules dérivées des crêtes neurales avait également été rapportée au cours d'une étude antérieure réalisée en 1994 (Reale et al., 1994).

II. Nétrine-1/Dcc un couple impliqué dans la survie des cellules de l'épithélium intestinal

Chez l'adulte l'expression de la Nétrine-1 est décrite au niveau des cellules épithéliales localisées à la base des cryptes **(Figure 19B-E)**. Contrairement au profil d'expression décrit dans l'embryon cette source semble être unique. Aucune expression de Nétrine-1 n'a en effet été rapportée dans les couches les plus externes de l'intestin tel que dans la musculeuse ou au niveau des plexi myentériques (Mazelin et al., 2004). Au cours de leur étude réalisée en 2004, Mazelin et *al.* révélèrent également l'expression de Dcc dans l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal adulte. Suite à ces observations et en accord avec le concept de récepteur à dépendance, il fut proposé que le couple Nétrine-1/Dcc régule la mort des cellules épithéliales le long de l'axe crypte/villus. La Nétrine-1 sécrétée à la base des cryptes intestinales permettrait ainsi d'établir un gradient le long de cet axe et d'inhiber la mort des cellules épithéliales induite par Dcc. Au cours de leur migration, les cellules différenciées

seraient soumises à des concentrations de Nétrine-1 de plus en plus limitantes jusqu'à atteindre le sommet des villi où, en absence de Nétrine-1, elles seraient éliminées par une mort apoptotique dépendante de Dcc.
La génération de souris sur-exprimant de façon constitutive la Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal, *i.e* sous la dépendance du promoteur Fabp1, étaya cette hypothèse. En effet bien que cette sur-expression ne conduise pas à un changement de statut de prolifération ou de différenciation, une diminution de 50% de la mort cellulaire fut observée (Mazelin et al., 2004). Ceci fut confirmé par une seconde étude au cours de laquelle il fut montré que les souris mutées sur le site intracellulaire de Dcc requis à l'induction de voie pro-apoptotique (D1290) présentaient un pourcentage de cellules apoptotiques fortement réduit au niveau de l'épithélium intestinal, en comparaison aux souris contrôles sauvages (Castets et al., 2012). Chez l'adulte la Nétrine-1 jouerait donc un rôle de facteur de survie, régulant l'homéostasie épithéliale.

III. Nétrine-1/Dcc un équilibre requis à l'homéostasie intestinale

Les études menées sur les souris sur-exprimant de façon constitutive la Nétrine-1 sous la dépendance du promoteur Fabp1 ou sur les souris invalidées pour la voie pro-apoptotique du récepteur à dépendance Dcc permirent également de mettre en lumière le rôle de ce couple dans la tumorigénèse colorectale. En effet la simple surexpression de la Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal suffit à induire la formation de lésions adénomateuses chez 17% des animaux, tant dans l'intestin grêle que dans le colon. De plus, chez des souris prédisposées aux cancers colorectaux, *i.e* de fond génétique APC^{1638N}, cette sur-expression conduit à une importante augmentation du nombre d'adénomes de haut grade (Mazelin et al., 2004). La Nétrine-1 apparaît donc importante dans le processus de progression tumorale. De la même façon, la réduction d'apoptose observée chez les souris invalidées pour la voie pro-apoptotique de Dcc est accompagnée par la formation de tumeurs intestinales spontanées. Des transformations néoplasiques furent en effet observées chez 15% des mutants. Dans le fond génétique APC^{1638N}, la fréquence d'adénocarcinomes observée est augmentée de 50% chez le mutants (Castets et al., 2012), suggérant le rôle de Dcc comme gène suppresseur de tumeurs.

La Nétrine-1 apparaît ainsi exprimée dans l'intestin grêle : lors du développement embryonnaire, au niveau des couches les plus externes du mésenchyme ainsi qu'à la base de l'épithélium ; chez l'adulte, par les cellules épithéliales localisées à la base des cryptes (Figure 19). Comme en témoignent les études présentées, le rôle de la Nétrine-1 dans cet organe a principalement été étudié au travers de ses interactions avec le récepteur Dcc, dont le profil d'expression reste néanmoins peu clair car contreversé. Lors du développement embryonnaire le couple Nétrine-1/Dcc participerait à la mise en place du système nerveux entérique alors que chez l'adulte celui-ci participerait au maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal et régulerait la survie des cellules épithéliales. Aujourd'hui le(s) potentiel(s) rôle(s) de la Nétrine-1 dans l'intestin grêle *via* son interaction avec d'autres récepteurs que Dcc reste(nt) à élucider.

RESULTATS

HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS DE THESE

A l'instar des ligands Wnt et Notch, qui constituent des facteurs essentiels de la niche des cellules souches intestinales adultes, la Nétrine-1 est exprimée par des cellules de l'épithélium intestinal localisées à la base des cryptes. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, cette molécule pléiotropique est impliquée dans certains tissus dans des processus de morphogénèse, de prolifération cellulaire, de migration et d'adhésion cellulaire ou encore de survie cellulaire. Ainsi, nous nous sommes donc demandé si, au sein des cryptes intestinales, la Nétrine-1 pouvait constituer un facteur clé de la niche des CSI et réguler leur auto-renouvellement, leur prolifération, leur différenciation et/ou leur survie.

De plus, sachant que (1) l'altération des facteurs de la niche intestinale peut conduire à une dérégulation du compartiment souche évoluant vers une néoplasie (Barker et al., 2009) et que (2) la Nétrine-1 joue un rôle dans la tumorigénèse intestinale (Mazelin et al., 2004), nous nous sommes également interrogés sur le rôle que pourrait jouer cette molécule dans le maintien des CSI transformées. Plus particulièrement, nous souhaitions déterminer si la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal pouvait altérer le maintien/la survie des CSI transformées et perturber par conséquent l'initiation et/ou la progression tumorale. Nous verrons que les résultats obtenus nous ont conduits à repenser les stratégies expérimentales mises en place pour ce deuxième volet « tumoral ». Or, compte tenu du temps incompressible requit à la génération et l'analyse de modèles murins prédisposés aux cancers intestinaux et invalidés pour la Nétrine-1, il ne m'a malheureusement pas été possible d'aborder celui-ci dans les temps impartis pour ma thèse.

Afin de déterminer si la Nétrine-1 constitue un facteur essentiel à la niche des CSI saines, nous avons entrepris d'étudier les conséquences d'une altération d'expression (perte ou sur-expression) de cette molécule dans l'épithélium de l'intestin grêle sur (1) le nombre de CSI Lgr5^{+} par crypte, ainsi que sur (2) leurs fonctions. Cette étude a donc nécessité l'utilisation de modèles murins de délétion et surexpression conditionnelle de la Nétrine-1.

Jusqu'à très récemment le seul modèle murin disponible d'invalidation du gène *Ntn1* était le modèle Ntn1-Lac-Z généré par une méthode de « gene-trap » (Serafini et al., 1996). Cette méthode qui consiste à introduire dans la séquence d'un gène cible un gène rapporteur dépourvu de tout éléments transcriptionnel permet (1) d'induire une perte de fonction du gène cible et (2) de visualiser son expression, puisque l'expression du gène rapporteur est placée sous la dépendance des éléments de régulation transcriptionnels de celui-ci. Dans le cas de la Nétrine-1, le gène rapporteur Lac-Z a été inséré de façon aléatoire dans un des introns du gène *Ntn1* (Skarnes et al., 1995). La protéine chimérique issue de cet allèle muté est une protéine transmembranaire notée Nétrine-1/ß-gal qui permet, grâce à l'activité de la ß-galactosidase, de visualiser les cellules exprimant la Nétrine-1. Les homozygotes mutants *Ntn1*-LacZ générés grâce à cette technique sont donc dépourvus du gène *Ntn1* de façon ubiquitaire et constitutive, rendant impossible l'étude de la délétion de la Nétrine-1 dans un tissu spécifique. De plus ce modèle génétique s'est révélé létal. En effet les homozygotes mutants meurent dans les heures suivant leur naissance, probablement des conséquences d'un trop grand nombre de défauts de guidage axonal. Cette létalité empêche donc toute étude visant à déterminer le rôle de la Nétrine-1 dans les stades post-nataux. Enfin, le modèle murin *Ntn1-LacZ* est un modèle hypomorphe. Une faible quantité d'ARN messager du gène *Ntn1* sauvage subsiste en effet chez les mutants homozygotes, résultant d'un probable épissage de l'ARN pré-messager de l'allèle muté autour des exons insérés (Serafini et al., 1996). Ce modèle murin ne constitue donc pas un *knock-out* complet de la Nétrine-1 (Serafini et al., 1996), (Bin et al., 2015), (Yung et al., 2015). La génération d'un nouveau modèle murin de délétion conditionnelle de la Nétrine-1 s'est donc révélée indispensable à l'investigation du rôle de cette protéine chez l'adulte ainsi qu'à l'étude des conséquences de la perte de Nétrine-1 dans une population cellulaire spécifique de l'embryon. À mon arrivée au laboratoire, la génération de ce nouveau modèle, nommé Nétrine-1lox ou Ntn1-lox, venait d'être initiée. Mon projet de thèse a donc débuté par le croisement de ce nouveau modèle murin avec plusieurs lignées murines exprimant la recombinase Cre sous différents promoteurs et par la caractérisation de celui-ci.
En parallèle, j'ai également travaillé à la caractérisation d'un nouveau modèle murin de surexpression conditionnelle de la Nétrine-1, généré au laboratoire avant mon arrivée. La première partie de mes résultats sera donc consacrée à la caractérisation de ces deux modèles murins.

Dans une seconde partie je présenterai les résultats obtenus, grâce à ces modèles, sur le(s) rôle(s) potentiel(s) de la Nétrine-1 dans la régulation du compartiment souche intestinal et le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal adulte.

La troisième et dernière partie sera consacrée au(x) rôle(s) de la Nétrine-1 au cours du

développement embryonnaire de l'intestin grêle murin. En effet, la caractérisation de nos nouveaux modèles murins m'a permis de constater qu'au cours de l'ontogénèse intestinale le niveau d'expression de la Nétrine-1 est particulièrement élevé dans les stades embryonnaires, puis diminue drastiquement au moment de la naissance, avant de ré-augmenter quelque peu vers les stades post-nataux P10 et de se stabiliser. Ces observations nous ont donc amenés à nous questionner sur le rôle de la Nétrine-1 et de ces récepteurs dans le développement de l'intestin. Je présenterai ici les conséquences de la perte de la Nétrine-1 sur l'ontogénèse intestinale.

Pour terminer, ma thèse fut également l'opportunité de participer à deux projets collaboratifs de recherche. Le premier, en collaboration avec l'équipe du Dr A. Chédotal a conduit cette année à une publication remettant en cause le dogme selon lequel la Nétrine-1 sécrétée par les cellules de la plaque du plancher serait nécessaire et suffisante à l'attraction des neurones commissuraux à la ligne médiane ventrale (Dominici et al., 2017). Cette publication est présentée en Annexe 1. Le second projet, en collaboration avec l'équipe du Dr F. Lavial, a mené à une publication actuellement en soumission à Nature. Cette dernière étude montre qu'au sein des cellules souches embryonnaires de souris la Nétrine-1 agit de façon bifonctionnelle en fonction du récepteur engagé. La signalisation induite par le couple Nétrine-1/Néogénine promeut ainsi l'auto-renouvellement de ces cellules souches alors que celle induite par le couple Nétrine-1/Unc5-B participe à leur engagement dans un processus de différenciation. Le résumé de cette publication est présenté en Annexe 2 (Ozmadenci et *al.*, en soumission).

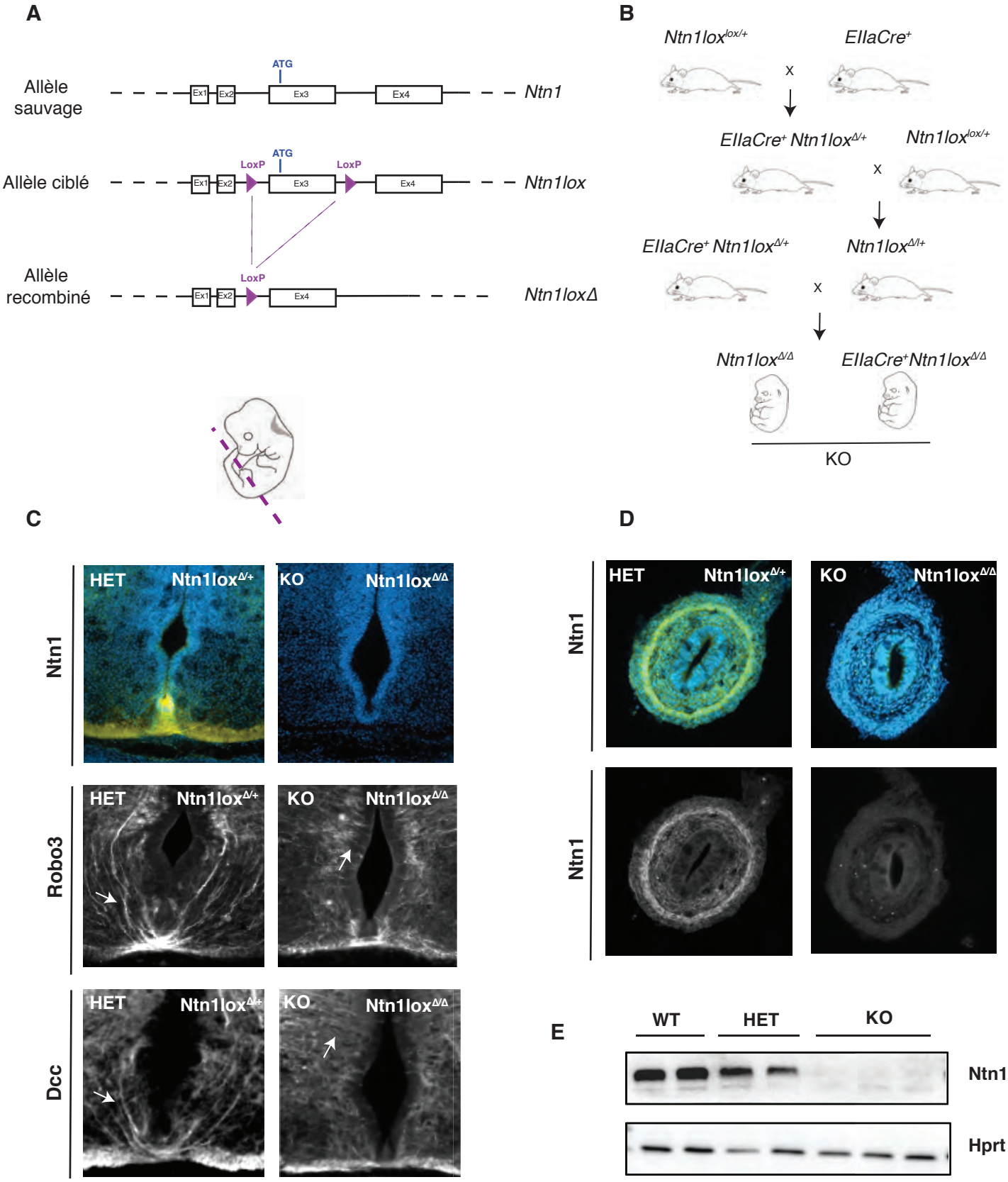
VALIDATION DES LIGNEES MURINES

I. Génération et validation de la lignée murine d'invalidation conditionnelle de la *Nétrine-1*

Dans le but d'étudier les conséquences de la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte notamment, et d'investiguer le rôle potentiel de cette protéine dans le maintien du compartiment souche intestinal, un modèle murin de délétion conditionnelle de la Nétrine-1 (Nétrine-1lox ou Ntn1lox) a été généré au laboratoire par l'insertion de sites LoxP de part et d'autre du 3ème exon de la Nétrine-1, exon codant pour le codon start. L'induction de la recombinaison Cre/Lox par une recombinase Cre conduit à l'excision de cet exon **(Figure 20A)** et à la perte d'expression de la protéine Nétrine-1.

Afin de valider ce modèle murin, les souris Nétrine-1lox ont été croisées avec la lignée murine EIIa^{Cre} exprimant de façon constitutive la recombinase Cre dans les lignées germinales mâles et femelles notamment. Après trois générations, ces croisements ont permis d'obtenir des individus homozygotes délétés de façon ubiquitaire de l'exon 3 du gène *Ntn1* (individus notés *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$) **(Figure 20B)**. A E19 les individus *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ étaient présents en proportions mendéliennes (6/26 embryons). Néanmoins au jour post-natal 1 (P1) aucun petit *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ n'a pu être observé (sur 56 individus). Tout comme les mutants hypomorphes *Ntn1-LacZ* (*Ntn1*$^{LacZ/LacZ}$), les mutants *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ meurent dans les heures suivant leur naissance.

Dans la moelle épinière en développement la Nétrine-1 guide les projections axonales des neurones commissuraux, localisés en position dorsale, vers la plaque du plancher, en position ventrale, où ils traversent la ligne médiane. Chez les mutants hypomorphes *Ntn1*$^{LacZ/LacZ}$ la plupart des axones commissuraux projettent de façon aberrante vers la zone ventriculaire ou vers la colonne motrice. Néanmoins de part la persistance d'une faible quantité de Nétrine-1 dans la moelle épinière, quelques rares axones commissuraux parviennent à être guidés à la plaque du plancher et à traverser la ligne médiane ventrale (cf Annexe 1, Dominici et al., 2017). Contrairement à ces mutants hypomorphes, aucune


A
Allèle sauvage
ATG
Ex1
Ex2
Ex3
Ex4
Ntn1
Allèle ciblé
LoxP
Ntn1lox
Allèle recombiné
Ntn1loxΔ
B
Ntn1lox^lox/+
EIIaCre+
x
EIIaCre+ Ntn1lox^Δ/+
Ntn1lox^lox/+
EIIaCre+ Ntn1lox^Δ/+
Ntn1lox^Δ/+
Ntn1lox^Δ/Δ
EIIaCre+Ntn1lox^Δ/Δ
KO
C
Ntn1
Robo3
Dcc
HET
Ntn1lox^Δ/+
KO
Ntn1lox^Δ/Δ
D
Ntn1
E
WT
HET
KO
Ntn1
Hprt

protéine Nétrine-1 n'est détectée dans la moelle épinière des mutants *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ à E13.5, que se soit à la plaque du plancher ou au niveau des cellules progénitrices neuronales localisées dans les deux tiers ventraux de la zone ventriculaire **(Figure 20C)**. S'il subsiste la possibilité qu'une ou plusieurs formes de Nétrine-1 tronquées soient produites chez ces mutants et ne soient pas reconnues par l'anticorps utilisé, la visualisation des axones commissuraux par immunohistochimie indique que ces formes sont non fonctionnelles. En effet les marquages Robo3 et Dcc, spécifiques des axones commissuraux dans la moelle épinière, révèlent une incapacité totale de ces derniers à atteindre la plaque du plancher et à traverser la ligne médiane ventrale (**Figure 20C** et Annexe 1, Dominici et *al.,* 2017). N'étant plus guidés en position ventrale, ces axones présentent des projections aberrantes en direction de la zone ventriculaire notamment **(Figure 20C)**. Ces résultats confirment qu'au niveau de la moelle épinière, le modèle murin EIIaCre ; Nétrine-1lox phénocopie bien le modèle *knock-out* constitutif Ntn1-LacZ. Contrairement à ce dernier la perte d'expression de l'isoforme protéique fonctionnelle de la Nétrine-1 est complète.

Au niveau des intestins grêles des individus *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ la perte d'expression totale de Nétrine-1 est également observée, par immunohistochimie et par Western Blot (n=3) **(Figure 20D)**. La lignée Nétrine-1lox peut donc être utilisée afin d'invalider spécifiquement la Nétrine-1 dans un tissu ou type cellulaire d'intérêt.

Figure 20 : Génération et validation du modèle murin d'invalidation conditionnelle de la Nétrine-1 (Ntn1lox).

A. Le modèle murin Ntn1lox a été généré par l'insertion de sites LoxP de part et d'autre du 3ème exon du gène *Ntn1*, exon codant pour le codon start. La recombinaison Cre/Lox conduit à l'excision de cet exon et à la génération d'un allèle recombiné noté *Ntn1loxΔ*. Ce dernier ne permet plus de produire la forme sauvage fonctionnelle de la protéine Nétrine-1.

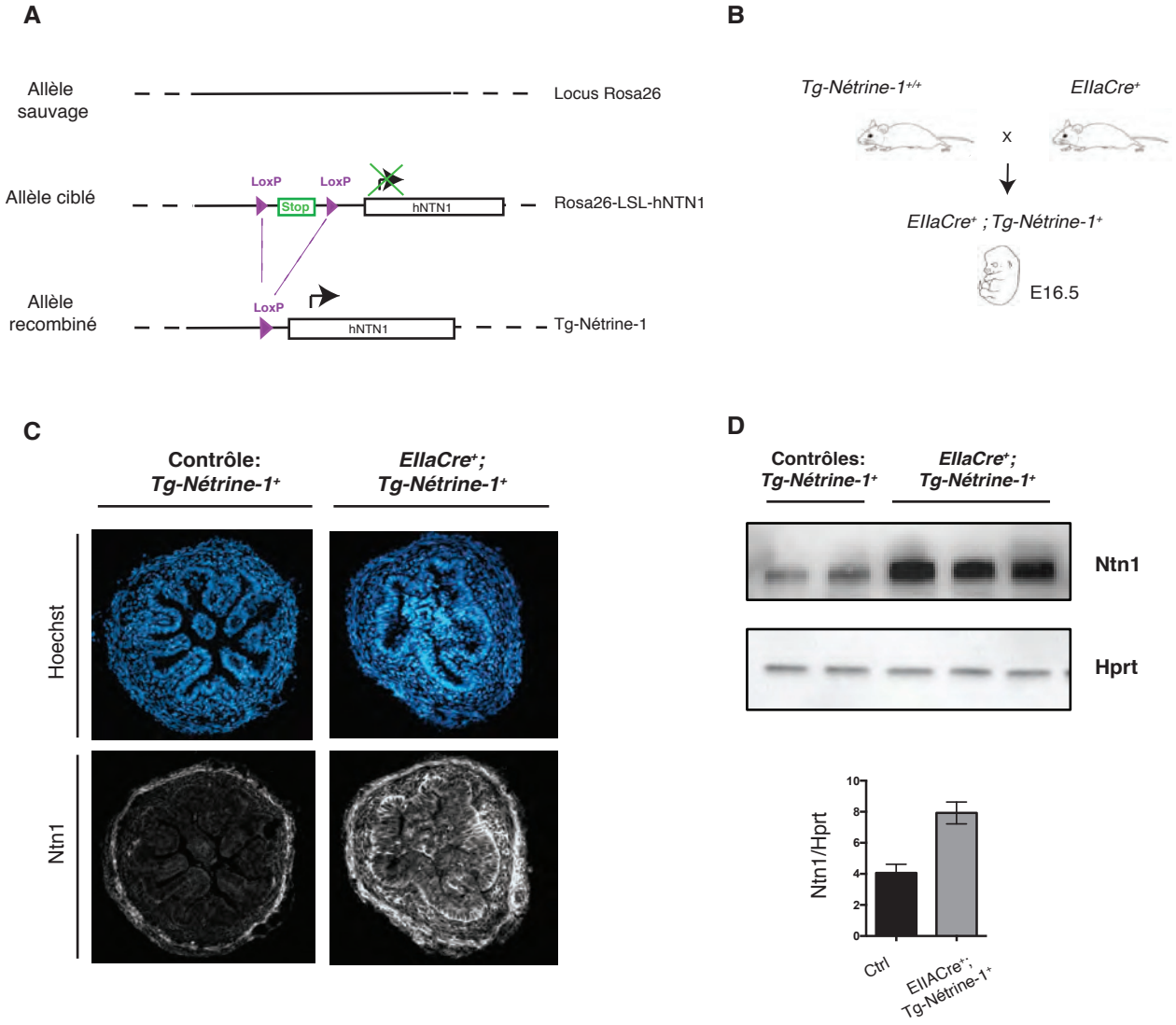
B. Le croisement de la lignée murine Ntn1lox avec la lignée EIIa^{Cre}, exprimant la recombinase Cre de façon ubiquitaire, notamment dans les lignées germinales mâles et femelles, permet de générer des individus *EIIaCre*$^{+}$*; Ntn1lox*$^{\Delta/+}$ porteurs d'un allèle *Ntn1* recombiné. Le croisement de deux individus hétérozygotes conduit à l'obtention de mutants *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ (KO) au sein desquels les deux allèles *Ntn1* sont inactivés dès le stade cellule œuf.

C. Immunomarquages de la Nétrine-1 et des axones des neurones commissuraux dans la moelle épinière d'embryons à E13.5. Chez les individus contrôles hétérozygotes *Ntn1lox*$^{\Delta/+}$ (HET), la Nétrine-1 est détectée au niveau de la plaque du plancher, en position ventrale, ainsi qu'au niveau des progéniteurs neuronaux situés dans les deux tiers ventraux de la zone ventriculaire. Les axones commissuraux visualisés par les immunomarquages Robo3 et Dcc sont guidés à la plaque du plancher (flèches) où ils traversent la ligne médiane ventrale. Chez les KO *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ la forme sauvage de la Nétrine-1 n'est plus détectée et les axones des neurones commissuraux ne sont plus guidés à la ligne médiane ventrale. Ceux-ci projettent de façon aberrante en direction de la zone ventriculaire (flèches).

D. Immunomarquage anti-Nétrine-1 sur intestins grêles au stade embryonnaire E13.5.

E. Western blot anti-Nétrine-1 sur lysats d'intestins grêles à E16 d'individus contrôles sauvages (WT) et hétérozygotes Ntn1lox$^{\Delta/+}$ et d'individus KO *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta,}$ issus de la même portée.

Au stade de développement E13.5 et E16 aucune trace de Nétrine-1 n'est détectée dans l'intestin grêle des individus KO *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ (D et E). Le modèle murin Ntn1lox permet une perte d'expression totale de la Nétrine-1 (C-E).



<u>Figure 21 :</u> Génération et validation du modèle murin de surexpression conditionnelle de la Nétrine-1 humaine (lignée Rosa26-LSL-hNTN1 ou Tg-hNétrine-1).

A. Le modèle murin de surexpression conditionnelle de la Nétrine-1 repose sur l'insertion du gène codant pour la Nétrine-1 humaine, précédé d'une cassette stop transcriptionnelle, dans le locus ubiquitaire Rosa26. Après recombinaison Cre/Lox le gène codant pour la Nétrine-1 humaine est exprimé sous le contrôle de l'activité promotrice endogène du locus Rosa26.

B. Le croisement de la lignée murine Tg-hNétrine-1 (Tg-hNTN1) avec la lignée EIIaCre induit une létalité embryonnaire aux environs du stade de développement E16.5.

C. Immunomarquage anti-Nétrine-1 sur intestin grêle au stade embryonnaire E15.5.

D. Western-blot anti-Nétrine-1 sur intestin grêle au stade embryonnaire E15.5 et quantification protéique.
Au stade embryonnaire E15.5 la Nétrine-1 est surexprimée de façon ubiquitaire dans l'intestin grêle des individus EIIaCre$^+$; Tg-hNTN1$^+$ (C). Chez ces animaux le niveau d'expression protéique de Nétrine-1 est environ deux fois supérieure à la quantité de protéine endogène détectée chez les animaux contrôles (D).

II. Génération et validation du modèle murin de surexpression conditionnelle de *Nétrine-1*

En opposition à la perte de Nétrine-1 nous avons souhaité déterminer si le gain de cette protéine pouvait également perturber le compartiment souche intestinal adulte. Pour ce faire, nous avons donc utilisé un modèle murin de surexpression conditionnelle de Nétrine-1 généré par l'insertion d'une cassette LoxP-Stop-LoxP (LSL) suivie de la séquence du gène humain *NTN1,* dans le locus ubiquitaire Rosa26 **(Figure 21A)**. L'action d'une recombinase Cre conduit à l'excision du stop transcriptionnel et à l'expression du transgène codant pour la Nétrine-1 humaine sous l'activité promotrice endogène du locus Rosa26.

Du fait de l'absence jusqu'alors de modèle murin de surexpression ubiquitaire de Nétrine-1, nous ne connaissons pas les conséquences phénotypiques d'un tel gain de Nétrine-1 sur le développement embryonnaire. La génération du modèle Rosa26-LSL-hNétrine-1 ouvre donc la voie à ces investigations et l'étude des conséquences de cette surexpression sur le développement du SNC est actuellement l'objet d'une collaboration entre notre laboratoire et celui du Dr A. Chédotal.

Dans le cadre de cette thèse, la validation de la lignée Rosa26-LSL-hNétrine-1 (Tg-*hNétrine-1* ou Tg-*hNTN1*) a été réalisée par le croisement de celle-ci avec la lignée murine EIIaCre **(Figure 21B)**. Ces croisements ont révélé que la surexpression précoce et ubiquitaire de Nétrine-1 n'est pas viable. En effet, nous observons une létalité embryonnaire aux alentours du stade de développement E16.5, d'une cause encore non identifiée.
A E15.5, dans l'intestin grêle d'animaux contrôles, la Nétrine-1 est exprimée au niveau de la couche externe du mésenchyme, par les cellules de la musculeuse et ou du plexus myentérique. Chez les animaux *EIIaCre*$^{+}$ *; Tg-hNétrine-1*$^{+}$, la Nétrine-1 humaine est exprimée dans l'ensemble des types cellulaires constituants l'intestin grêle **(Figure 21C)**. La protéine Nétrine-1 détectée chez les individus contrôles correspond à la Nétrine-1 endogène murine, l'anticorps utilisé ciblant les formes murine et humaine de cette protéine. La quantification du niveau d'expression de Nétrine-1 par Western Blot révèle une augmentation d'expression d'environ deux fois chez les animaux *EIIaCre*$^{+}$*; Tg-Nétrine-1*$^{+}$, en comparaison aux animaux contrôles **(Figure 21D)**. La fonctionnalité du modèle de surexpression conditionnelle de Nétrine-1 est donc validée. Contrairement à des surexpressions classiques placées sous la dépendance de promoteurs forts tels que CMV ou CAGGS, la surexpression du transgène hNTN1 apparaît relativement faible car placée, par choix, sous l'activité promotrice endogène du locus Rosa26.

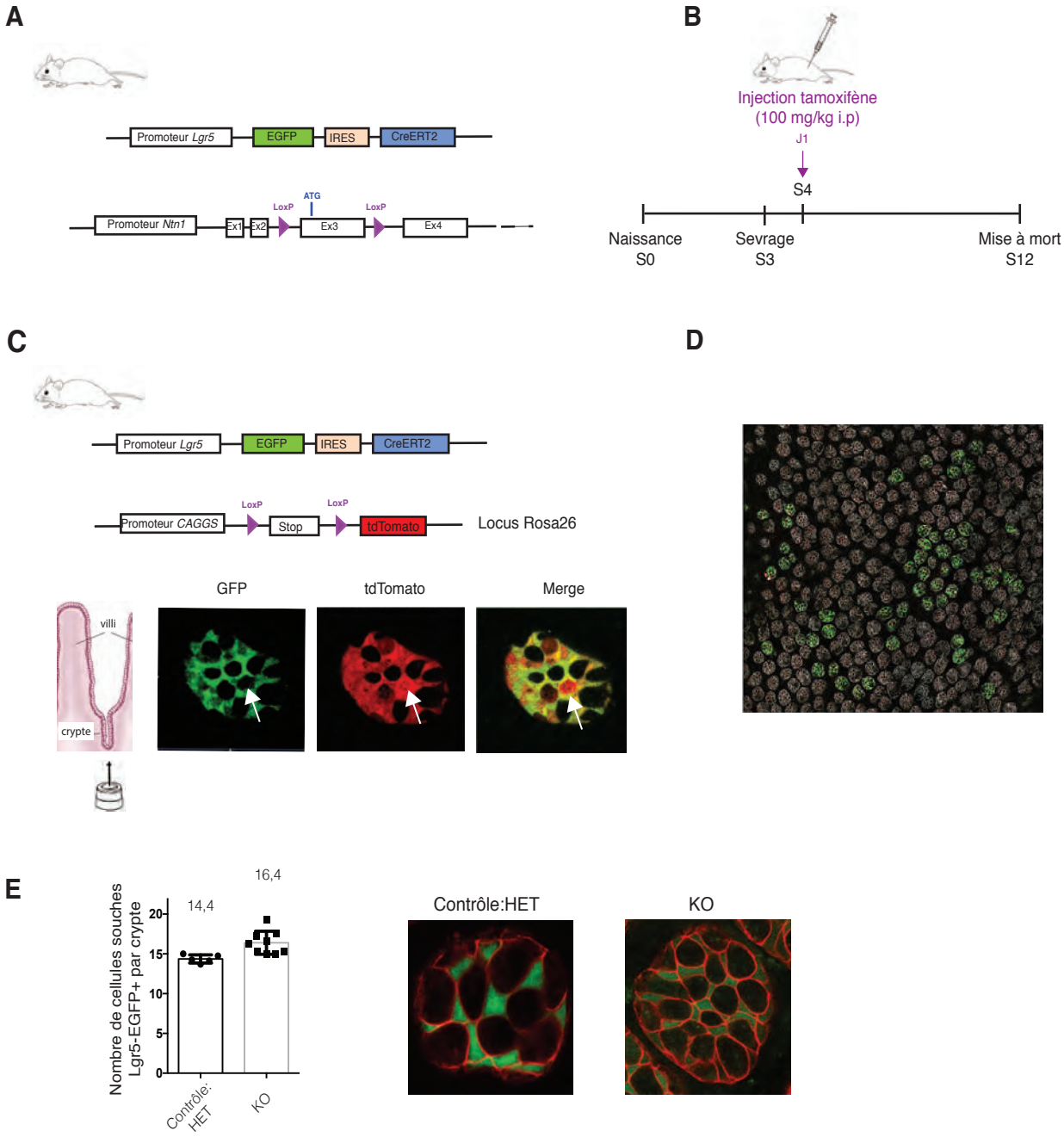


Figure 22 : La perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte n'affecte pas le nombre de CSI par crypte *in vivo*.

A. Le modèle murin Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 ; Nétrine-1lox permet d'exciser de façon conditionnelle et irréversible le 3ème exon du gène *Nétrine-1* spécifiquement dans les CSI Lgr5$^+$ ainsi que dans l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal qui en dérive. Le gène rapporteur EGFP placé sous la dépendance du promoteur Lgr5 permet de visualiser et compter les CSI Lgr5$^+$.

B. La perte d'expression de Nétrine-1 au sein des CSI a été induite par une injection intra-péritonéale unique de tamoxifène (100mg/kg) 4 semaines après la naissance. Les intestins grêles des animaux ont été prélevés 8 semaines après induction de la recombinaison Cre/Lox.

C. L'injection intra-péritonéale unique de tamoxifène à 4 semaines est suffisante à induire la recombinaison Cre/Lox chez le modèle murin rapporteur Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 ; Rosa26-LSL-tdTomato. 5 jours après injection, l'expression du rapporteur tdTomato est observée dans l'ensemble des CSI Lgr5-EGFP$^+$ ainsi que dans certaines cellules de Paneth nouvellement formées (flèche). Observation de la base des cryptes intestinales en microscopie confocale.

D. Le modèle murin Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 présente une forte expression mosaïque du transgène EGFP-IRES-CreERT2.

E. Quantification du nombre de CSI Lgr5-EGFP$^+$ par crypte intestinale chez les animaux contrôles hétérozygotes *Lgr5 :CreERT2$^+$; Nétrine-1lox$^{\Delta/+}$* (HET) et chez les KO *Lgr5 :CreERT2$^+$; Nétrine-1lox$^{\Delta/\Delta}$* (KO). Le nombre de CSI Lgr5-EGFP$^+$ par crypte, estimé à 14 ±2 en conditions physiologiques, n'est pas significativement altéré en absence de Nétrine-1 épithéliale. Le marqueur épithélial Epcam (en rouge) permet d'individualiser chaque cellule.

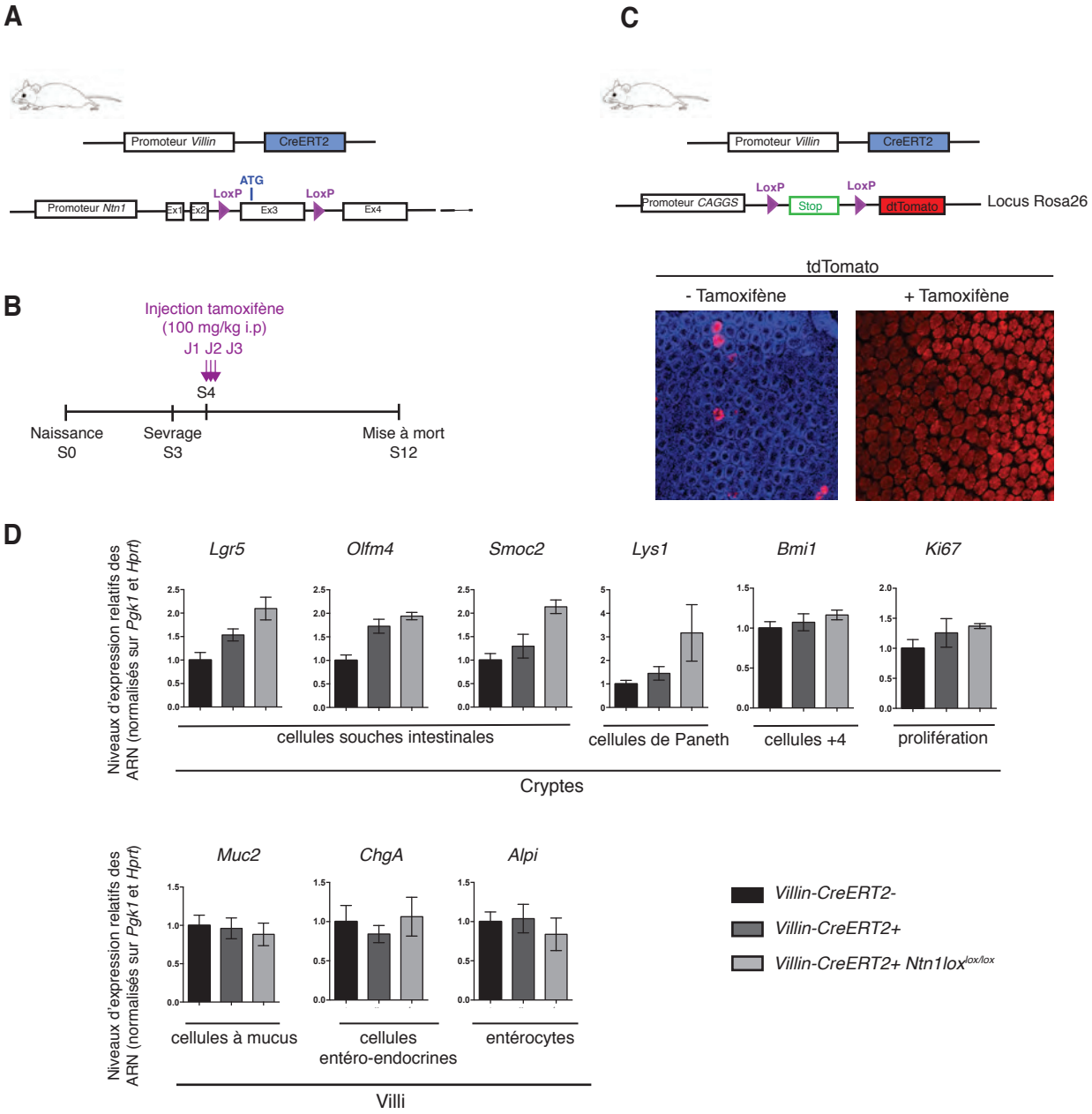
NETRINE-1 ET CSI ADULTES

I. Conséquences de la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte sur le compartiment souche.

A. *In vivo,* la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte n'altère pas le nombre de cellules souches intestinales Lgr5$^+$ par crypte.

Dans l'intestin adulte, l'expression de la Nétrine-1 est décrite dans l'épithélium à la base des cryptes. Pour déterminer si celle-ci participe à la régulation du nombre de cellules souches intestinales Lgr5$^+$ par crypte, nous avons tiré avantage du modèle murin Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 généré par le laboratoire du docteur Hans Clevers. Le croisement de ce modèle murin avec notre modèle Nétrine-1lox nous a permis (1) d'invalider la Nétrine-1 spécifiquement dans les CSI et dans l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal qui en dérive, mais également (2) de pouvoir déterminer le nombre de CSI Lgr5-EGFP$^+$ par crypte **(Figure 22A)**. La recombinaison Cre/Lox a été induite par une injection intra-péritonéale de tamoxifène 4 semaines après la naissance des animaux ; temps auquel la structure et la physiologie définitive de l'épithélium intestinal adulte sont acquises et auquel les cellules de Paneth sont pleinement matures. Les animaux ont ensuite été mis à mort 8 semaines après injection afin de s'assurer que l'ensemble des cellules de Paneth (d'une durée de vie d'environ 6 semaines) ait été régénéré et ait hérité de la recombinaison Cre/Lox initiée dans les CSI **(Figure 22B)**. L'efficacité de cette recombinaison a été validée grâce au modèle rapporteur Lgr5 :CreERT2 ; Rosa26-LoxP-Stop-LoxP-tdTomato. Comme le montre la **Figure 22C**, 5 jours après l'injection unique de tamoxifène, l'expression du rapporteur tdTomato est observée dans l'ensemble des CSI Lgr5-EGFP$^+$ ainsi que dans certaines cellules de Paneth nouvellement formées.

La validation de notre modèle d'étude nous a également confirmé les limites du modèle murin Lgr5-EFGP-IRES-CreERT2 qui présente un fort mosaïsme d'expression du transgène EGFP-IRES-CreERT2 **(Figure 22D)**, (Schuijers et al., 2014). Au sein du modèle Lgr5 :CreERT2 ; Nétrine-1lox, la recombinaison Cre/lox a donc lieu dans un nombre limité de



<u>Figure 23 :</u> Chez l'adulte, la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal induit une augmentation d'expression de marqueurs spécifiques des CSI et des cellules de Paneth.

A. Représentation schématique du modèle murin Villin-CreERT2 ; Netrine-1lox permettant d'invalider de façon conditionnelle la Nétrine-1 dans l'ensemble de l'épithélium intestinal. Ce modèle a été généré afin d'analyser les profils d'expression géniques des cryptes et des villi en présence et absence de Nétrine-1.

B. Procédure expérimentale de l'induction de la recombinaison Cre/Lox au sein du modèle Villin-CreERT2 ; Nétrine-1lox et du temps de prélèvements des intestins grêles. L'excision du 3ème allèle de la Nétrine-1 a été induite par 3 injections intra-péritonéales successives de tamoxifène 4 semaines après la naissance des animaux. Les intestins ont été prélevés 8 semaines post injection. J : Jour.

C. La dose et fréquence de tamoxifène administrée aux animaux suffit à induire l'expression du rapporteur tdTomato au sein du modèle Villin-CreERT2 ; Rosa26-LSL-tdTomato. 5 jours post-injection la quasi totalité des cellules épithéliales expriment le rapporteur tdTomato. Le modèle de recombinase Villin-CreERT2 présente une fuite extrêmement faible en absence de tamoxifène et ne présente pas de mosaïsme d'expression, le rapporteur dtTomato étant observé dans 100% des cryptes intestinales après injection de tamoxifène.

D. Analyse par RT-PCRq des niveaux d'expression de gènes spécifiques des CSI (*Lgr5, Olfm4, Smoc2*), de la population +4 (*Bmi1*), des cellules de Paneth (*Lys1*), de la prolifération (*Ki67*) et de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires constituants les villi (*Muc2, ChgA, Alpi*). La perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal induit une augmentation d'expression des marqueurs souches intestinaux tels que *Lgr5 et Smoc2* ainsi que du marqueur spécifique des cellules de Paneth *Lys1*.

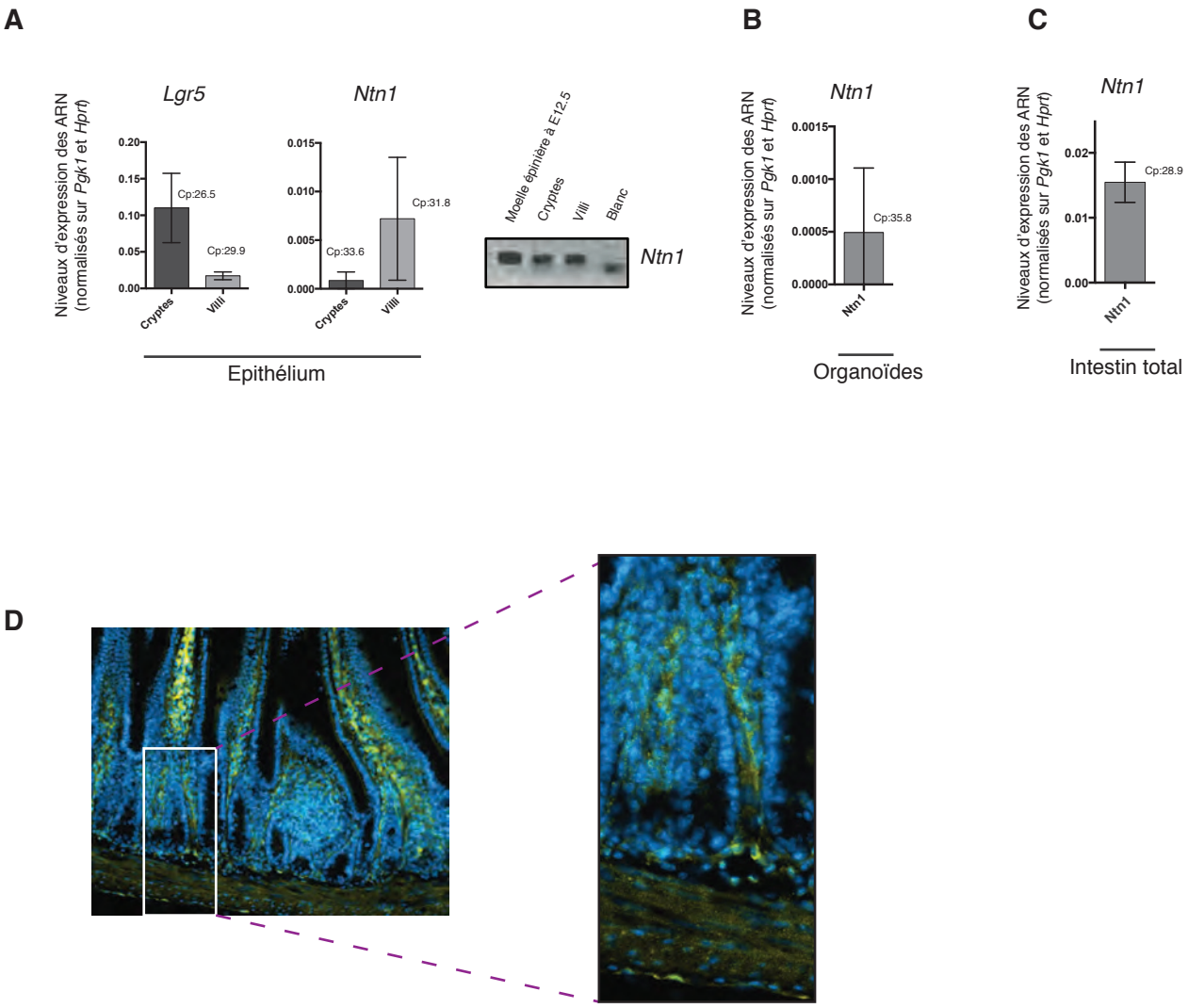
cryptes intestinales et conduit à la délétion partielle de la Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal. Ce modèle apparaît ainsi inadapté à l'étude d'expression génique ou protéique globale, ou nécessite de pouvoir isoler les cryptes et villi porteurs de la recombinaison Cre/Lox.

Chez les souris contrôles le nombre de cellules souches Lgr5-EGFP$^+$ par crypte est d'environ 14 (n=5) **(Figure 22E)** ; ±2 d'après Barker et al., 2007, Snippert et al., 2010. Chez les souris délétées de la Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal celui-ci est d'environ 16 (n=9). La délétion de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal semble donc augmenter le nombre de CSI par crypte. Néanmoins compte tenu de la littérature selon laquelle les cryptes intestinales contiennent 14 ± 2 CSI Lgr5$^+$ (Barker et al., 2007), (Snippert et al., 2010), cette augmentation ne semble pas significative. Nous concluons ici que la perte d'expression de Nétrine-1 au sein de l'épithélium intestinal n'affecte pas le nombre de CSI Lgr5-EGFP$^+$ par crypte.

B. *In vivo*, la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte augmente l'expression de certains marqueurs spécifiques des CSI.

Afin d'étudier les conséquences d'une perte totale de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal sur les profils d'expression génique des compartiments souche (cryptes) et différencié (villi), un nouveau modèle de délétion conditionnelle de la Nétrine-1 a du être généré. Le modèle Nétrine-1lox a donc été croisé avec le modèle de recombinase Villin :CreERT2 dont l'expression restreinte à l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal ne présente pas de mosaïsme **(Figure 23A)**. Comme en témoigne le modèle rapporteur Villin :CreERT2 ; Rosa26-LSL-tdTomato, 5 jours après induction de la recombinaison Cre/Lox par injection intra-péritonéale de tamoxifène, l'expression du rapporteur tdTomato est observée dans 100% des cryptes intestinales **(Figures 23B et C)**. Le dosage et la fréquence des injections de tamoxifène, choisis en accord avec la littérature, semblent donc suffisants à induire l'excision de l'exon 3 de la Nétrine-1 dans le modèle murin Villin :CreERT2 ; Nétrine-1lox.

L'analyse par RT-PCRq des profils d'expression de marqueurs spécifiques des différentes populations cellulaires de l'épithélium intestinal a révélé une augmentation des marqueurs souches *Lgr5* et *Smoc2*, ainsi qu'une augmentation du marqueur *Lys1*, spécifique des cellules de Paneth, chez les animaux dépourvus de Nétrine-1 épithéliale (n=3) **(Figure 23D)**. Les marqueurs spécifiques de la population +4 (*Bmi1*), de prolifération (*Ki67*), ou des



<u>Figure 24 :</u> La Nétrine-1 de l'intestin grêle adulte ne semble pas sécrétée par les cellules de l'épithélium intestinal mais par les cellules de la *lamina propria* et de la musculeuse.

A. Niveaux d'expression par RT-PCRq des gènes *Lgr5* et *Ntn1* au sein des fractions cryptes/villi après dissociation. Le niveau d'expression du gène *Lgr5* dans les fractions cryptes est très largement supérieur à celui observé dans les fractions villi, et valide l'enrichissement de chacune des fractions en cryptes ou villi. Le niveau d'expression du gène Ntn1 est extrêmement faible au sein de chacune des fractions. Le dépôt sur gel d'agarose des produits d'amplification confirme que le signal détecté est néanmoins bien celui de la *Ntn1*.

B. L'analyse du niveau d'expression du gène *Ntn1* par RT-PCRq au sein d'organoïdes intestinaux à 5 jours de culture révèle une absence d'expression de ce gène.

C. Le gène *Ntn1* est exprimé dans l'intestin grêle adulte total et est détecté par RT-PCRq à des niveaux largement supérieurs à ceux observés dans les fractions épithéliales cryptes/villi. Les Cp indiqués correspondent au niveau d'expression détecté pour une RT réalisée sur 500ng d'ARN totaux et des ADNc dilués 8 fois.

D. Immunomarquage anti-Nétrine-1 dans l'intestin grêle adulte. La Nétrine-1 est observée au niveau de la *lamina propria* ainsi qu'au niveau de la musculeuse.

cellules différenciées des villi (*Muc2, ChgA, Alpi*) présentent un niveau d'expression relativement constant en présence ou absence de Nétrine-1 épithéliale. Concernant le marqueur de CSI *Olfm4* nous ne pouvons conclure si la perte de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal affecte son expression, la simple expression de la recombinase CreERT2 chez les contrôles ayant engendrée une importante variation du niveau d'expression de ce gène. Ces résultats montrent donc que si la perte épithéliale de Nétrine-1 n'affecte pas le nombre de CSI par crypte, celle-ci semble néanmoins moduler le niveau d'expression de certains marqueurs spécifiques à cette population, ainsi que ceux des cellules de Paneth, acteurs essentiels de la niche des CSI. L'analyse statistique de ces résultats nécessite néanmoins d'augmenter le nombre d'individus par groupe.

C. La Nétrine-1 de l'épithélium intestinal : une source unique de Nétrine-1 dans l'intestin grêle adulte?

La perte d'expression du gène *Ntn1* dans l'épithélium intestinal et plus particulièrement dans les cryptes intestinales des animaux Villin-CreERT2^{+}, Nétrine-1$^{lox/lox}$ a été analysée par RT-PCRq *via* l'utilisation de différents jeux d'amorces, dont l'un spécifique de l'exon 3 loxé. De façon suprenante, le niveau d'expression de *Ntn1* au sein de l'épithélium intestinal des animaux contrôles s'est révélé particulièrement faible et ne présente pas d'expression différentielle significative entre cryptes et villi **(Figure 24A).** Les dissociations cryptes/villi réalisées ici ont été validées par l'analyse de marqueurs propres à chaque compartiment, tel que *Lgr5*, *Olfm4, Smoc2* pour le compartiment crypte et *Krt20, Klf4* pour le compartiment villi (**Figure 24A** et données non présentées).
Bien que faible, le signal obtenu pour le gène *Ntn1* dans les compartiments cryptes et villi est apparu spécifique, comme en témoignent les dépôts sur gels d'agarose des produits d'amplification **(Figure 24A)** ainsi que l'analyse des « melting curves » (données non présentées). Toutefois, chez les animaux Villin-CreERT2^{+}, Nétrine-1$^{lox/lox}$ les niveaux d'expression de *Ntn1* se sont révélés semblables à ceux observés chez les individus contrôles (données non présentées). Ces résultats suggèrent que soit (1) la délétion conditionnelle de *Nétrine-1* opérée au sein de l'épithélium intestinal, dans les conditions expérimentales présentées, n'est pas efficace, soit (2) que le niveau d'expression basal de *Nétrine-1* dans l'épithélium intestinal est trop faible pour être modulé à la baisse, soit (3) que la Nétrine-1 détectée n'est pas d'origine épithéliale. Lors de la technique de dissociation cryptes/villi, l'épithélium intestinal est simplement détaché du reste du tissu par un traitement à l'EDTA. Ainsi, si les cellules épithéliales ne sont pas par la suite triées sur la base de marqueurs spécifiques en cytométrie en flux, les fractions cryptes/villi ne constituent pas des fractions

épithéliales pures mais représentent plutôt ce que l'on appelle des enrichissements au sein desquelles substituent des cellules mésenchymateuses. La Nétrine-1 détectée pourrait ainsi être produite par ces dernières.
À l'inverse, les cultures d'enteroïdes de plusieurs jours représentent des cultures épithéliales pures, les conditions de cultures n'étant pas adaptées à la survie des cellules mésenchymateuses. Au sein de ces cultures, à jour 5, le niveau d'expression du gène *Ntn1* n'est pas détectable (n=5) **(Figure 24B)**. De plus, dans le tissu intestinal complet le niveau d'expression du gène *Ntn1* est bien plus important (n=3) **(Figure 24C)**, suggérant que la Nétrine-1 détectée dans les fractions cryptes/villi puisse résulter de la présence d'une faible proportion de cellules non épithéliales, sources de Nétrine-1.
Afin de tester cette hypothèse et de déterminer si la Nétrine-1 est ou non exprimée par les cellules de l'épithélium intestinal, nous avons souhaité investiguer la localisation de la Nétrine-1 dans l'intestin grêle adulte par différentes techniques. Bien que les hybridations *in situ anti-Nétrine-1* fonctionnent parfaitement sur coupes de moelles épinières embryonnaires, et que celles *anti-Villin* et *anti-Klf4* fonctionnent parfaitement sur coupes d'intestins grêles de souris adultes, nous n'avons pu obtenir de signal pour la Nétrine-1 dans l'intestin (données non présentées). Toutefois, l'immunomarquage anti-Nétrine-1 révèle pour sa part un signal dans la *lamina propria*, ainsi qu'un signal plus faible au niveau de la musculeuse **(Figure 24D)**. La génération d'un modèle de délétion conditionnelle ubiquitaire de la Nétrine-1 : Rosa26 :CreERT2 ; Nétrine-1lox devrait permettre de tester la spécificité de ce marquage. A l'heure actuelle, les groupes d'animaux contrôles Nettrine-1$^{lox/lox}$ et Rosa26 :CreERT2^{+} ; Netrine-1$^{lox/lox}$ ont été obtenus et la recombinaison Cre/Lox induite par trois injections intra-péritonéales successives de tamoxifène à l'âge adulte. Les intestins prélevés 12 semaines après induction sont en cours de traitement.

Outre ces expériences de marquages anti-Nétrine-1, l'analyse des études déposées dans les bases de données montre que sur puce ADN l'expression de *Ntn1* n'est détectée ni dans les CSI Lgr5^{+}, ni dans les cellules de Paneth (GSE25109). De façon similaire, celle-ci n'est que très faiblement détectée dans les cellules Lgr5^{+} triées et analysées sur plateforme Nanostring (GSE100831). Nous souhaitions également regarder les niveaux d'expression de *Ntn1* au sein de la signature des cellules souches intestinales Lgr5^{+} publiée par Muñoz et *al.* en 2012 (GSE33949) ainsi qu'au sein du transcriptome des cellules de Paneth publié par Sato et *al.* en 2011 (GSE25109) mais le format publié de ces dernières ne nous l'ont pas permis. L'analyse de celles-ci nécessiterait l'intervention de bio-informaticiens.
Enfin, l'analyse des données de séquençage haut débit des populations de myofibroblastes intestinaux sous-épithéliaux post-nataux et adultes, publiée par Lei et *al.* en 2014, révèle une expression effective relativement faible de *Ntn1* dans la population adulte, expression qui apparaît néanmoins supérieure à celle de *Wnt2b,* facteur essentiel de la niche des CSI. Cette

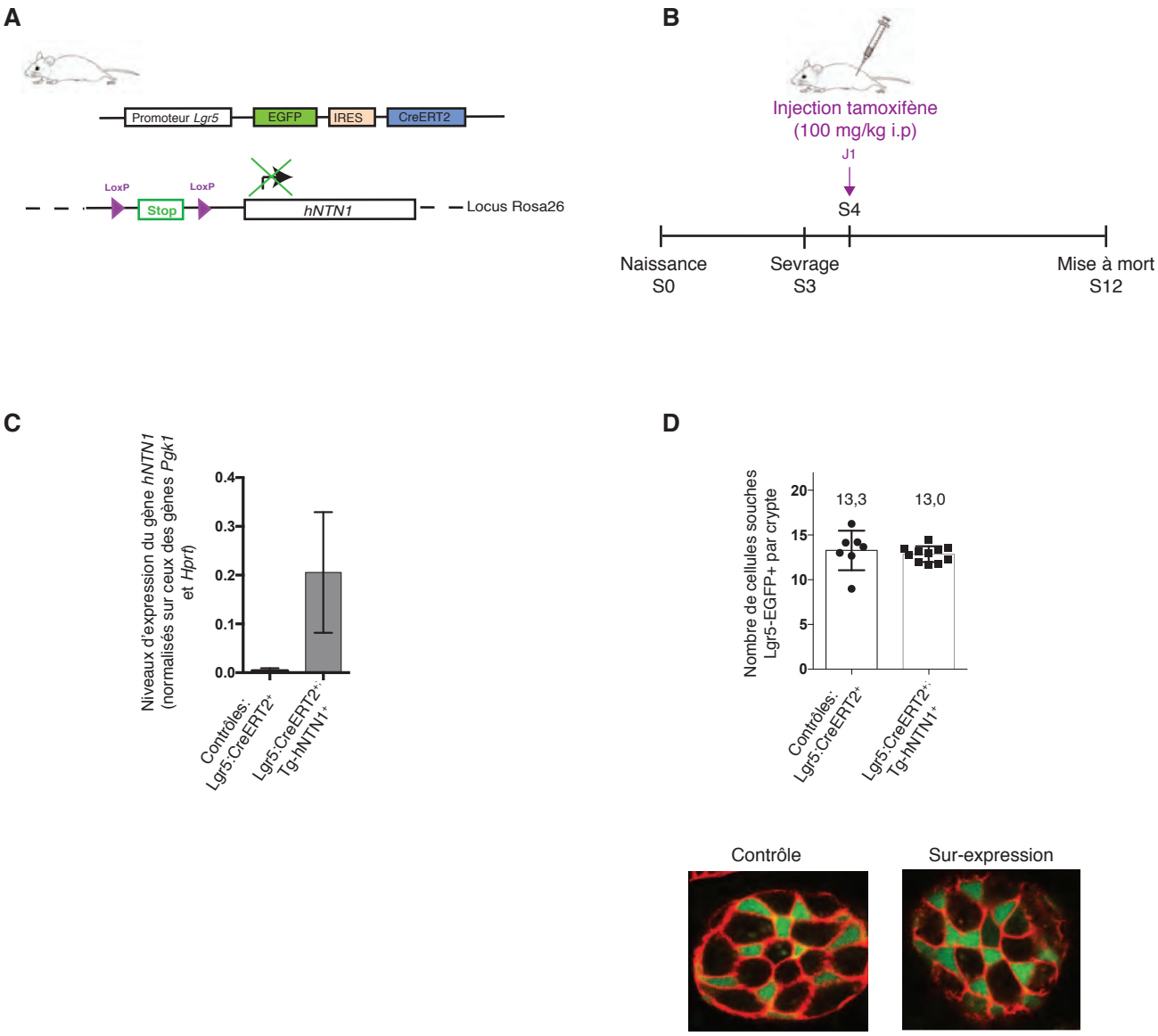
étude révèle également que le niveau d'expression de *Ntn1* dans les myofibroblastes sous-épithéliaux est 10 fois plus important aux stades postnataux qu'aux stades adultes (GSE52402).

Concernant les récepteurs à la Nétrine-1 dans les populations cellulaires abordées ici, Néogénine et Unc5-B sont détectés dans les CSI et les cellules de Paneth. De façon intéressante, Néogénine semble cependant exprimé à des taux plus élevés dans les CSI que dans les cellules de Paneth alors qu'à l'inverse l'expression de Unc5-B semble plus importante dans les cellules de Paneth que dans les CSI. Les myofibroblastes sous-épithéliaux expriment également ces deux récepteurs (GSE25109) et (GSE52402).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la Nétrine-l n'est pas ou n'est que très faiblement exprimée dans l'épithélium intestinal adulte. Les variations d'expression génique des marqueurs souches intestinaux observées chez les animaux Villin :CreERT2^{+}; Netrine-1$^{lox/lox}$ ne seraient donc pas directement liées à la perte d'expression de la Nétrine-1.

Aujourd'hui, la ou les origine(s) cellulaire(s) de la Nétrine-1 dans l'intestin restent à redéfinir. Néanmoins, l'expression de *Ntn1* dans la *lamina propria*, notamment dans les myofibroblastes sous épithéliaux ainsi que l'expression des récepteurs Unc5-B par les CSI et les cellules de Paneth, et de Néogénine et Unc5-B par les myofibroblastes sous épithéliaux n'excluent pas un possible rôle de la Nétrine-1 dans la régulation du compartiment souche intestinal et plus largement dans le maintien l'homéostasie épithéliale. L'analyse des animaux Rosa26 : CreERT2 ; Nétrine-1lox devrait permettre d'investiguer ce rôle.

Parallèlement à l'étude du rôle de la Nétrine-1 dans la régulation du compartiment souche intestinal en conditions physiologiques, nous avions initié les croisements murins devant permettre d'étudier le rôle de la Nétrine-1 épithéliale dans le maintien des CSI tumorales. Compte tenu des incertitudes sur la localisation réelle de la Nétrine-1 au sein de l'intestin, la recombinase Cre épithéliale choisie pour cette étude s'est avérée peu appropriée. Une recombinase ubiquitaire apparaît plus adaptée. Malheureusement le temps requis à la génération d'un nouveau modèle murin de prédisposition aux cancers colorectaux et de délétion conditionnelle ubiquitaire de la Nétrine-1 ne m'a pas permis d'aborder ce volet au cours de ma thèse.



<u>Figure 25 :</u> *In vivo*, le gain de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte n'affecte pas le nombre de CSI par crypte.

A. Représentation schématique du modèle de surexpression conditionnelle de la Nétrine-1 humaine dans l'épithélium intestinal : Lgr5-EGFP-CreERT2 ; Tg-hNétrine-1.

B. Représentation schématique du plan d'expérimentation. La recombinaison Cre/Lox a été induite par une injection intra-péritonéale unique de tamoxifène 4 semaines après la naissance des animaux et les intestins grêles prélevés 8 semaines après injection.

C. Quantification par RT-PCRq du niveau d'expression du transgène *hNTN1* dans les intestins grêles des animaux contrôles *Lgr5 :CreERT2*$^+$ et des animaux *Lgr5 :CreERT2*$^+$ *; Tg-hNTN1*$^+$.

D. Quantification du nombre de CSI Lgr5-EGFP$^+$ par crypte, chez les animaux sur-exprimant la Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal et les animaux contrôles. En rouge : le marqueur épithélial Epcam.

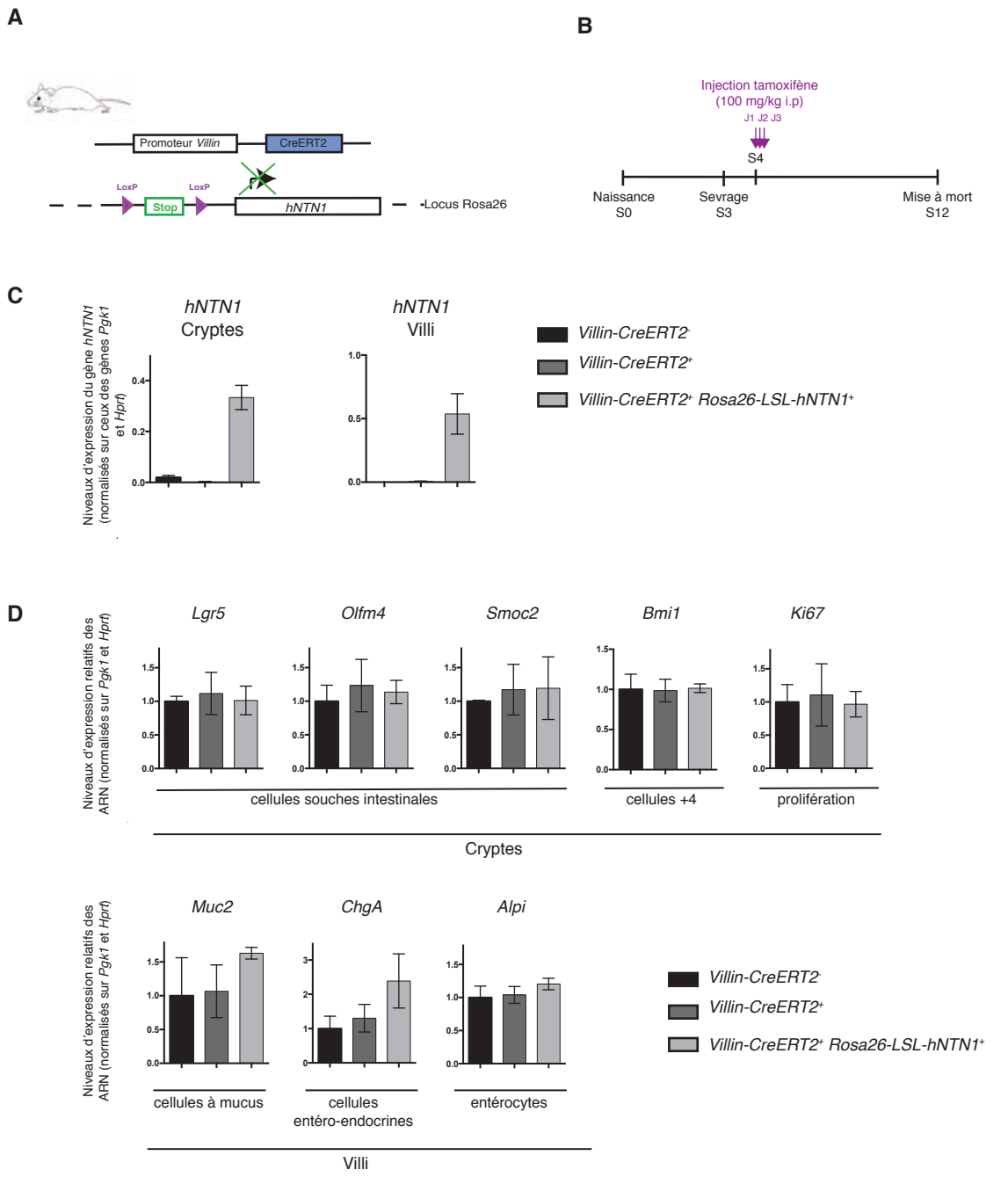
II. Conséquences de la surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte sur le compartiment souche.

A. *In vivo* le gain de Nétrine-1 dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte n'altère pas le nombre de CSI Lgr5⁺ par crypte.

Dans le but de déterminer si le gain de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal conduit à une altération du nombre de CSI par crypte, le modèle murin Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 a été croisé avec le modèle de surexpression conditionnelle de la Nétrine-1 **(Figure 25A)**. L'analyse de l'expression du transgène h*NTN1* par RT-PCRq huit semaine après injection unique de tamoxifène **(Figure 25B)** révèle une expression effective de celui-ci, fortement hétérogène entre individus **(Figure 25C)**. Nous proposons que cette hétérogénéité dans le niveau d'expression du transgène h*NTN1* puisse être la résultante (1) d'une différence d'efficacité du tamoxifène entre individus et/ou (2) de l'expression mosaïque de la CreERT2 utilisée, plus importante chez certains individus que chez d'autres. Dans ce dernier cas, le niveau d'expression réel du transgène h*NTN1* au sein des cryptes apparaît difficile à déterminer, la RT-PCRq ayant été réalisée sur des ARN extraits à partir de l'épithélium intestinal total. Bien que non quantitatives, des expériences d'hybridation *in situ* ou d'immunomarquages anti-Nétrine-1 sur coupes pourraient renseigner sur l'expression de la Nétrine-1 humaine au sein des cryptes et villi arborant la recombinaison Cre/Lox.
Le comptage des cellules EGFP⁺ par microscopie confocale révèle qu'*in vivo* le nombre de CSI Lgr5⁺ par crypte est identique entre les individus contrôles et ceux présentant un gain de Nétrine-1 **(Figure 25D)**. La sur-expression de la Nétrine-1 humaine dans l'épithélium intestinal adulte ne module donc pas le nombre de CSI par crypte.

B. *In vivo* la surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium de l'intestin grêle adulte n'affecte pas le profil d'expression génique des CSI.

Afin d'étudier les conséquences d'une surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal sur les profils d'expression géniques du compartiment souche et des cellules différenciées des villi nous avons généré le modèle murin Villin-CreERT2 ; Rosa26-LSL-h*NTN1* **(Figure 26A)**.
Huit semaines après induction de la recombinaison **(Figure 26B-C)**, les profils d'expression



<u>Figure 26 :</u> Effet de la surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte sur les profils d'expression géniques des compartiments souche et différencié.

A. Représentation schématique du modèle murin Villin :CreERT2 ; Tg-hNTN1 utilisé pour surexprimé la Nétrine-1 humaine dans l'épithélium intestinal. La CreERT2 inductible est exprimée et placée sous l'activité du promoteur Villin, spécifique des cellules de l'épithélium intestinal. Après induction, la cassette transcriptionelle LoxP-Stop-LoxP en amont du gène codant pour la Nétrine-1 est excisée et le transgène Nétrine-1 humaine est exprimé.

B. L'expression du transgène *hNTN1* a été induite par 3 injections intra-péritonéales successives de tamoxifène, 4 semaines après la naissance des animaux. Les intestinaux grêles ont été prélevés 8 semaines après induction de la surexpression.

C. Quantification par RT-PCRq du niveau d'expression du transgène *hNTN1* dans les cryptes et villi de l'épithélium intestinal, 8 semaines après induction de la recombinaison Cre/Lox.

D. Quantification par RT-PCRq des niveaux d'expression relatifs de marqueurs de : la population souche intestinale (*Lgr5, Olfm4 et Smoc2*), la population souche réservoir +4 (*Bmi1*), prolifération (*Ki67*), des cellules caliciformes sécrétrices de mucus (*Muc2*), des cellules entéro-endocrines (*ChgA*) et des cellules absorptives (*Alpi*) dans le jéjunum des animaux *Villin-CreERT2*$^+$ *; Tg-hNTN1*$^+$ 8 semaines après induction. La surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal n'affecte pas les niveaux d'expression génique des marqueurs souche et de prolifération mais semble néanmoins augmenter l'expression génique de certains marqueurs spécifiques du lignage sécréteur tels que *Muc2 et ChgA*.

géniques réalisés par RT-PCRq révèlent, qu'*in vivo,* le gain de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal n'altère ni l'expression des marqueurs souches *Lgr5*, *Olfm4*, *Smoc2,* ni celle du marqueur des cellules +4 *Bmi1*, ni même celle du marqueur de prolifération *Ki67*. Au niveau des villi, ce gain semble toutefois induire l'expression des marqueurs *Muc2* et *ChgA*, spécifiques du lignage sécréteur **(Figure 26D)**. Étonnamment l'expression du marqueur *Alpi*, spécifique du lignage absorptif, n'est pas affectée. La sur-expression de Nétrine-1 n'engendrerait donc pas une spécification des cellules progénitrices TA vers le lignage sécréteur, au dépend du lignage absorptif, mais conduirait plutôt à une augmentation d'expression de certains marqueurs au sein d'une population sécrétrice constante en nombre de cellules. Cette hypothèse nécessiterait d'être confirmée par des immunomarquages spécifiques de chaque type cellulaire afin de pouvoir déterminer le nombre de cellules absorptives et sécrétrices au sein de l'épithélium intestinal d'animaux sauvages et d'animaux surexprimant la Nétrine-1.

C. *Ex vivo,* le gain de Nétrine-1 augmente l'expression des marqueurs souches et accélère la croissance des organoïdes.

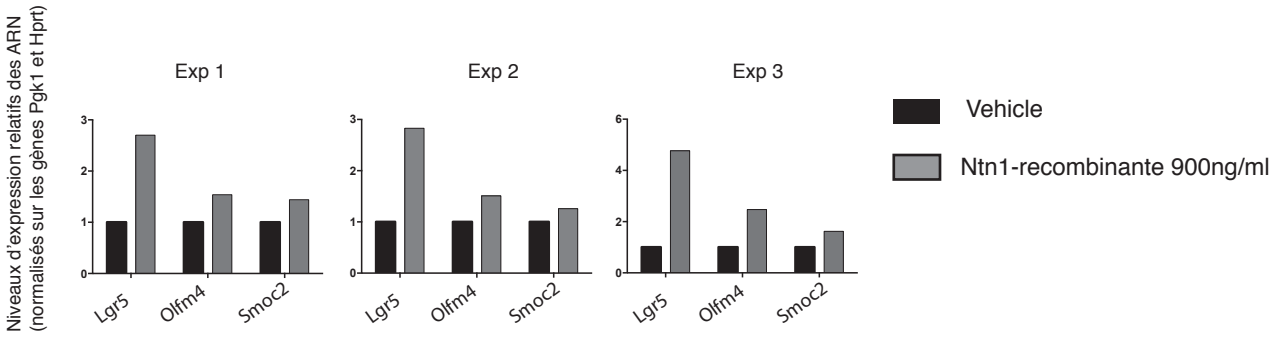
Pour déterminer si le gain de Nétrine-1 peut affecter les fonctions des CSI, *i.e* leur capacité d'auto-renouvellement et/ou leur multipotence, des cultures 3D d'organoïdes intestinaux ont été réalisées selon la méthode publiée par Sato et *al.* en 2009, en présence ou non de Nétrine-1.

L'ajout de Nétrine-1 recombinante (900 ng/ml) au milieu de culture d'organoïdes sauvages (WT) conduit à une augmentation d'expression des marqueurs de CSI *Lgr5*, *Olfm4* et *Smoc2* **(Figure 27A)**. *Ex vivo* la Nétrine-1 semble donc participer à la régulation du compartiment souche intestinal.

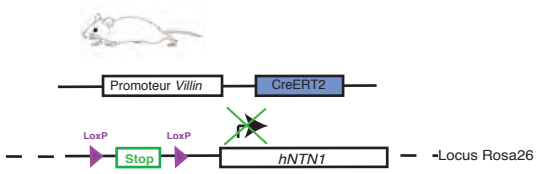
Dans le but de confirmer ces résultats, des cultures d'organoïdes transgéniques ont été réalisées à partir du modèle murin Villin :CreERT2 ;Tg-*hNTN1* **(Figure 27B)** et l'expression de la Nétrine-1 au sein de celles-ci induite par ajout de 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) au milieu de culture à Jour 0 (jour de mise en culture). La dose minimale et suffisante à l'induction de la recombinaison Cre/Lox a été déterminée grâce à des cultures d'organoïdes transgéniques Villin :CreERT2 ;Rosa26-LSL-tdTomato **(Figure 27C)**. Moins de 24h après traitement tamoxifène l'expression du rapporteur tdTomato est observée dans l'ensemble des types cellulaires constituant les organoïdes.

L'analyse phénotypique des organoïdes Villin :CreERT2 ; Rosa26-LSL-*hNTN1* révèle la capacité de la Nétrine-1 à promouvoir et accélérer la croissance de ces structures 3D. En effet dès le 2ème jour de culture, les cultures d'organoïdes surexprimant la hNétrine-1

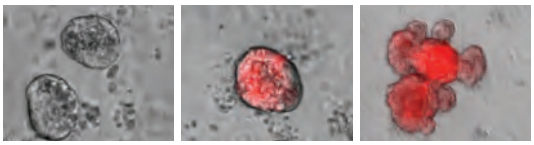
A



B

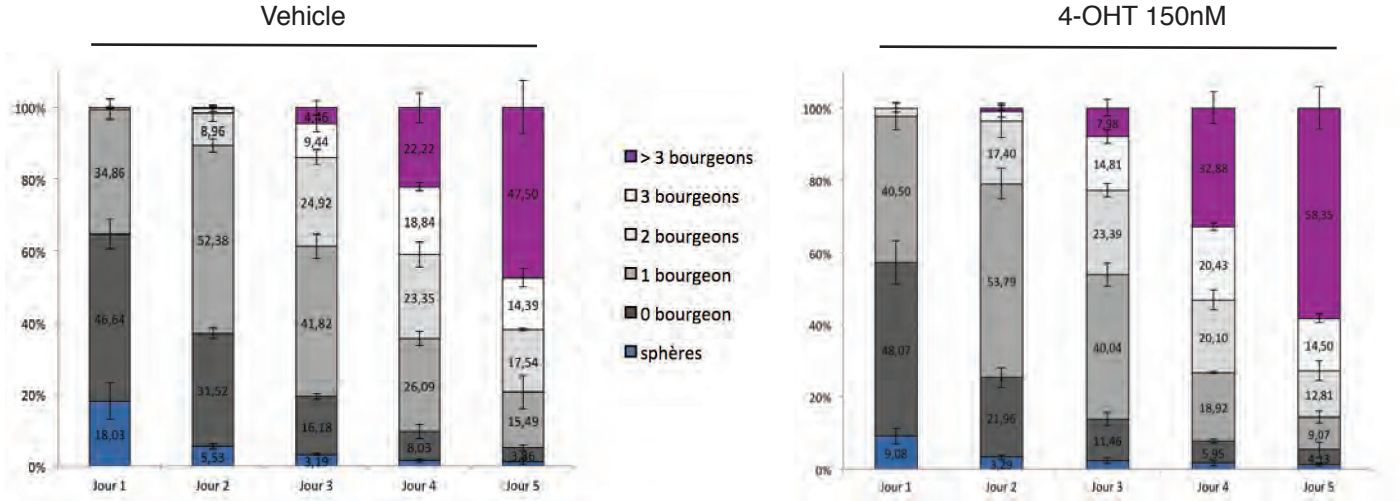


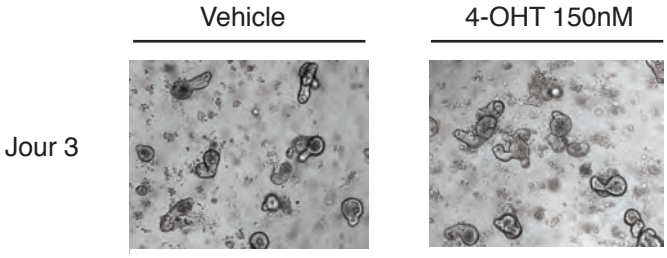
C



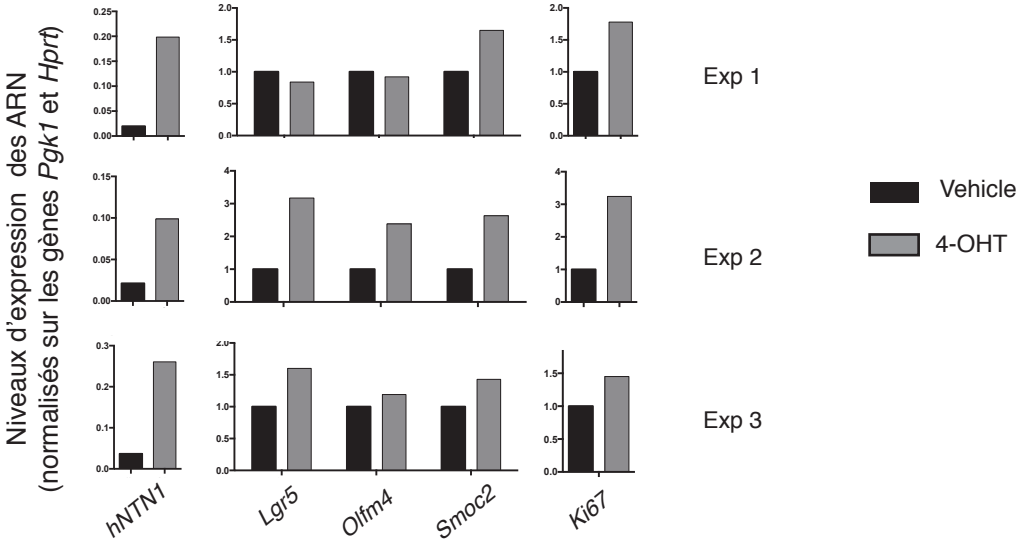
D

Organoïdes Villin-CreERT2⁺; Rosa26-LSL-*hNTN1*$^{+/+}$





E



présentent 9% de plus d'organoïdes à 2 bourgeons que les cultures d'organoïdes contrôles. De façon similaire, aux 4ème et 5ème jours de culture le pourcentage d'organoïdes complexes (présentant plus de 3 bourgeons) est augmenté de 10% en présence de hNétrine-1 **(Figure 27D)**.

Les niveaux d'expression géniques entre cultures d'organoïdes indépendantes, *i.e* réalisées à partir d'individus différents, présentent une importante variabilité. Néanmoins, l'analyse indépendante de chaque expérience montre que la présence de Nétrine-1 au sein des cultures induit une augmentation d'expression plus ou moins forte de marqueurs spécifiques des CSI tels *Lgr5*, *Olfm4* et *Smoc2,* ainsi que du marqueur de prolifération *Ki67* **(Figure 27E)**. Ces résultats confirment ainsi ceux obtenus avec les organoïdes sauvages traités avec de la Nétrine-1 recombinante. Toutefois, l'augmentation d'expression des marqueurs *Lgr5*, *Olfm4*, et *Smoc2* dans ces dernières apparaît plus importante et reproductible qu'au sein des cultures d'organoïdes transgéniques Villin :CreERT2 ;Tg-*hNTN1*.

Ex vivo, le gain de Nétrine-1 semble donc jouer un rôle dans la régulation du compartiment souche intestinal et promouvoir la croissance des organoïdes. Cette constatation renforce ainsi l'hypothèse selon laquelle *in vivo* la source majeure de Nétrine-1 intestinale ne serait probablement pas épithéliale.

Figure 27 : Ex vivo, la Nétrine-1 régule le compartiment souche intestinal et promeut la croissance des organoïdes.

A. Analyse par RT-PCRq du niveau d'expression des gènes *Lgr5, Olfm4 et Smoc2* (CSI) au sein de cultures d'organoïdes traitées ou non avec de la Nétrine-1. L'ajout de Nétrine-1 recombinante (900ng/ml) au milieu de culture d'organoïdes sauvages induit une augmentation d'expression des marqueurs de CSI.

B. Représentation schématique du modèle murin Villin-CreERT2 ; Rosa26-LSL-hNTN1 utilisé afin de générer des cultures d'organoïdes transgéniques surexprimant la Nétrine-1.

C. Induction de la recombinaison Cre/Lox au sein d'organoïdes rapporteurs Villin-CreERT2 ; Rosa26-LSL-tdTomato, par l'ajout de 150nM de 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) au milieu de culture à Jour 0. 24h après induction le 4-OHT a été retiré du milieu pour éviter toute toxicité.

D. Quantification du nombre de bourgeons par organoïdes sur les 5 premiers jours de culture. La surexpression de Nétrine-1 accélère et promeut la croissance des organoïdes.

E. Analyse par RT-PCRq des niveaux d'expression des gènes *hNTN1, Lgr5, Olfm4, Smoc2 et Ki67,* après 5 jours de culture, au sein d'organoïdes *Villin-CreERT2 ;Rosa26-LSL-hNTN1* traités ou non 4-OHT. L'expression du transgène *hNTN1* augmente l'expression des gènes *Lgr5, Olfm4* et *Smoc2* ainsi que celle du marqueur de prolifération *Ki67*. Les niveaux d'expression observés entre cultures indépendantes révèlent une importante variabilité mais une tendance néanmoins identique. Exp : Expérience indépendante.

ROLE DE LA NETRINE-1 AU COURS DE L'ONTOGENESE INTESTINALE

Au cours du développement embryonnaire de l'intestin, la Nétrine-1 est exprimée par des cellules non neuronales au niveau des couches externes du mésenchyme et à la base de l'épithélium. En cette localisation la Nétrine-1 permettrait d'attirer les cellules dérivées des crêtes neurales et de les guider jusqu'à l'emplacement du futur plexus sous-muqueux notamment. Ce rôle dans la mise en place du système nerveux entérique est décrit comme dépendant du récepteur Dcc.

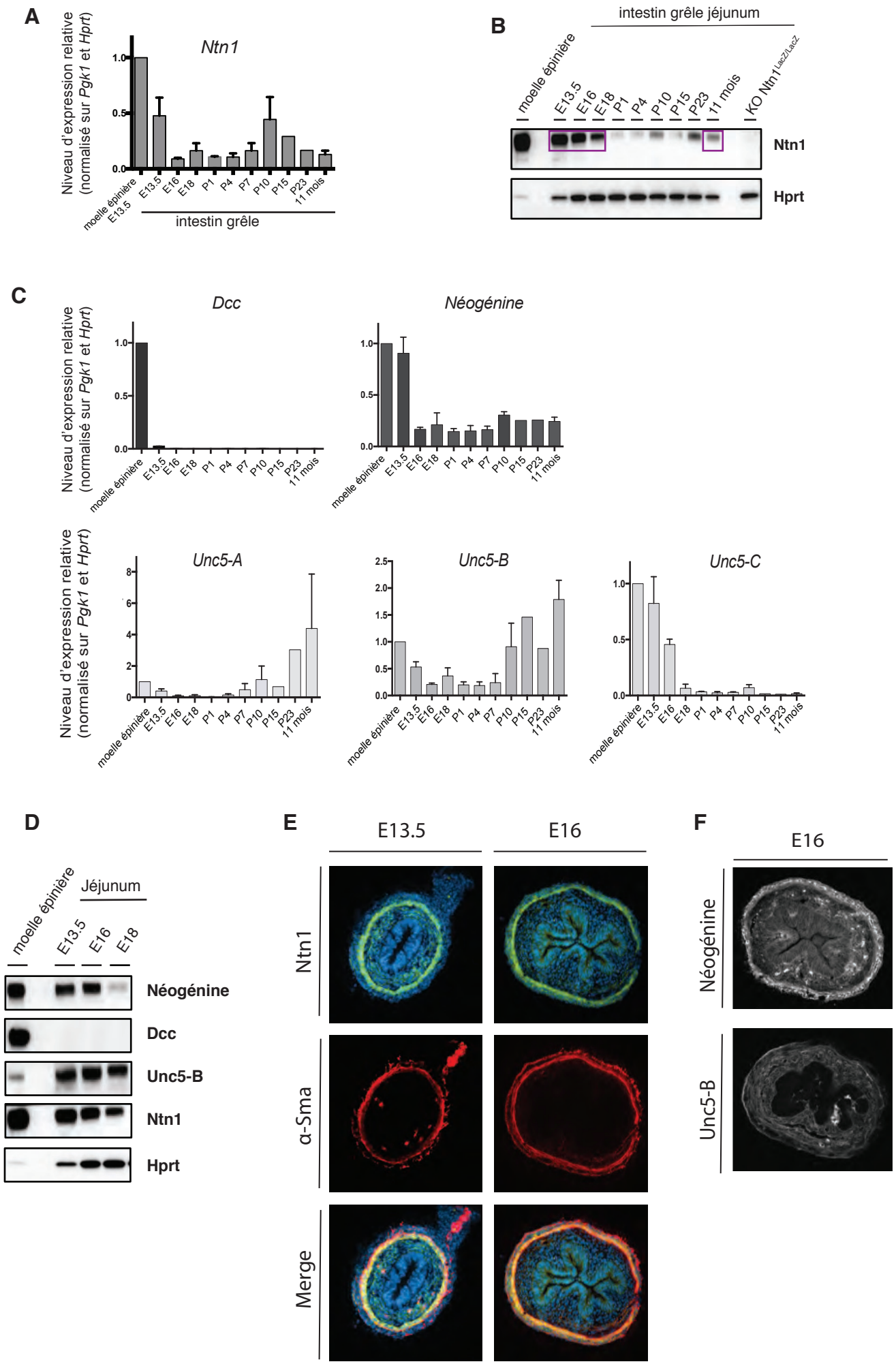
Afin de déterminer si le rôle de la Nétrine-1 au cours de l'ontogénèse intestinale est restreint à la mise en place du système nerveux entérique nous avons souhaité étudier si (1) d'autres récepteurs à la Nétrine-1 sont exprimés dans l'intestin, et si (2) la modulation d'expression de cette protéine affecte le développement embryonnaire dans ce tissu.

I. Profils d'expression de la Nétrine-1 et de ses récepteurs au cours du développement de l'intestin grêle.

A. Dans l'intestin foetal la forte expression de Nétrine-1 est accompagnée d'une forte expression des récepteurs Néogénine, Unc5-B et –C.

Dans l'intestin grêle de souris la Nétrine-1 est fortement exprimée aux stades prénataux **(Figure 28A et B)**. À la naissance son expression diminue fortement puis ré-augmente quelque peu vers les stades post-nataux P10 pour se stabiliser et perdurer tout au long de la vie **(Figure 28A et B)**.

Alors que l'expression de *Dcc* n'est détectée par RT-PCRq qu'aux stades précoces de développement de l'intestin **(Figure 28C et D)**, l'expression du récepteur *Néogénine* est elle détectée du stade embryonnaire E13.5 jusqu'à l'âge adulte **(Figure 28C)**. L'expression de récepteur est cependant extrêmement forte lors des stades précoces de développement et présente une importante diminution aux alentours du stade embryonnaire E16 **(Figure 28D)**.


A
Ntn1
Niveau d'expression relative (normalisé sur Pgk1 et Hprt)
moelle épinière
E13.5
E16
E18
P1
P4
P7
P10
P15
P23
11 mois
intestin grêle
B
intestin grêle jéjunum
KO Ntn1 LacZ/LacZ
Ntn1
Hprt
C
Dcc
Néogénine
Unc5-A
Unc5-B
Unc5-C
D
Jéjunum
Néogénine
Dcc
Unc5-B
Ntn1
Hprt
E
E13.5
E16
Ntn1
α-Sma
Merge
F
E16
Néogénine
Unc5-B

L'expression du récepteur *Unc5-A* relativement faible au cours du développement embryonnaire de l'intestin semble augmenter à partir du stade post-natal P7 et présenter un niveau d'expression maximal après sevrage **(Figure 28C)**. De façon symétrique l'expression du récepteur *Unc5-C* semble fortement diminuer du stade embryonnaire E13.5 à E18 **(Figure 28C)**. L'expression du récepteur *Unc5-B* est quant à elle relativement forte tout au long du développement intestinal mais semble connaître une augmentation à partir du stade post-natal P10 **(Figure 28C)**.

Aux stades de développement pré-nataux E13.5 et E16 la Nétrine-1 est particulièrement exprimée au niveau de la couche externe du mésenchyme où elle semble co-localiser avec les cellules α-Sma positives **(Figure 28E)**. À E16 les cellules exprimant ce marqueur appartiennent principalement à la couche musculeuse. Toutefois au cours du développement de l'intestin et de la maturation de cette couche cellulaire, l'expression du marqueur α-Sma n'est pas exclusive. Elle apparaît en effet commune à plusieurs populations cellulaires distinctes telles les cellules musculaires, les myofibroblastes ou encore les péricytes.

Figure 28 : Profils d'expression de la Nétrine-1 et de ses récepteurs dans l'intestin grêle au cours du développement.

A. Analyse par RT-PCRq du niveau d'expression du gène *Ntn1* dans le jéjunum, du stade embryonnaire E13.5 à l'âge adulte.

B. Analyse par Western Blot du niveau d'expression de la protéine Ntn1. La Nétrine-1 est fortement exprimée dans l'intestin grêle au cours du développement embryonnaire. A la naissance son niveau d'expression diminue fortement puis ré-augmente quelque peu aux alentours du stade post-natal P10 avant d'atteindre un niveau basal maintenu constant tout au long de la vie.

C. Analyse par RT-PCRq des niveaux d'expression des récepteurs *Dcc*, *Néogénine* et *Unc5* dans l'intestin grêle du stade embryonnaire E13.5 à l'âge adulte.

D. Analyse des niveaux d'expression protéiques des récepteurs Néogénine, Dcc et Unc5-B, par Western Blot, au cours du développement embryonnaire de l'intestin grêle.

E. Immunomarquages anti-Nétrine-1 et anti α-Sma sur intestins grêles aux stades embryonnaires E13.5 et E16. Au cours du développement embryonnaire de l'intestin grêle la Nétrine-1 est fortement exprimée par le mésenchyme, principalement au niveau de la couche la plus externe. La Nétrine-1 semble co-localiser avec les cellules de la musculeuse α-Sma positives.

F. Immunomarquages anti-Néogénine et anti-Unc5-B sur intestins grêles au stade embryonnaire E16. À E16 Néogénine est exprimé dans l'ensemble des couches cellulaires constituant l'intestin grêle. Son expression est particulièrement concentrée au niveau de la couche la plus externe du mésenchyme ainsi qu'à la base de l'épithélium. L'expression du récepteur Unc5-B est restreinte à l'ensemble mésenchyme et n'est pas détectée dans l'épithélium intestinal embryonnaire.

À E16 l'expression du récepteur Néogénine apparaît relativement ubiquitaire mais présente cependant une importante concentration au niveau des cellules α-Sma$^+$, qui pourraient constituer la source principale de Nétrine-1, ainsi qu'au niveau sous-épithélial **(Figure 28F)**. À ce même stade de développement l'expression du récepteur Unc5-B est observée dans l'ensemble du mésenchyme mais apparaît absente de l'épithélium **(Figure 28F)**. Pour des raisons de disponibilité et d'efficacité des anticorps les localisations des récepteurs Unc5-A et -C au sein de l'intestin grêle embryonnaire n'ont pas pu être déterminées. Des expériences d'hybridations *in situ* sont donc à envisager.

Compte tenu de l'expression de récepteurs à la Nétrine-1, autre que Dcc, au cours du développement intestinal, il est envisageable que la Nétrine-1 soit requise à d'autres processus que l'attraction des crêtes neurales et des cellules qui en dérivent.

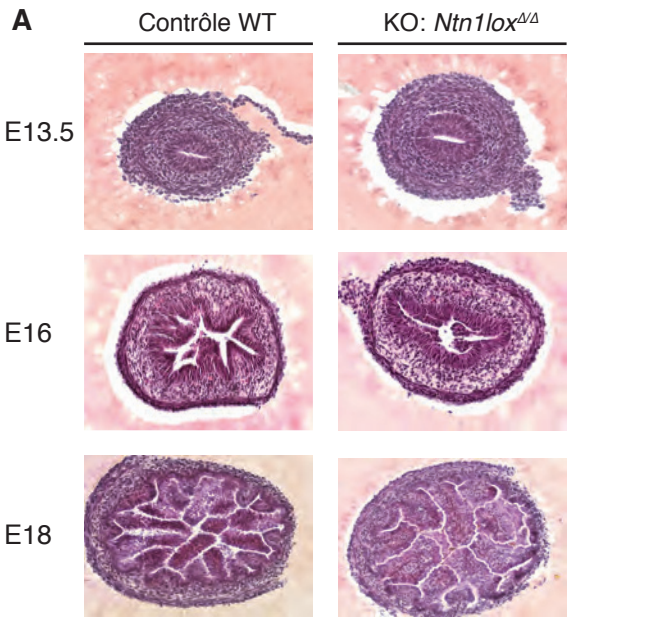
II. Conséquences de la modulation du niveau d'expression de Nétrine-1 sur l'ontogénèse intestinale.

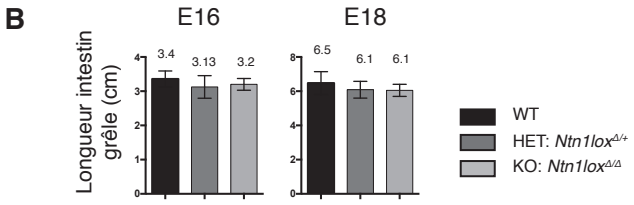
A. La perte de Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire retarde l'ontogénèse de l'épithélium intestinal et l'émergence des villi.

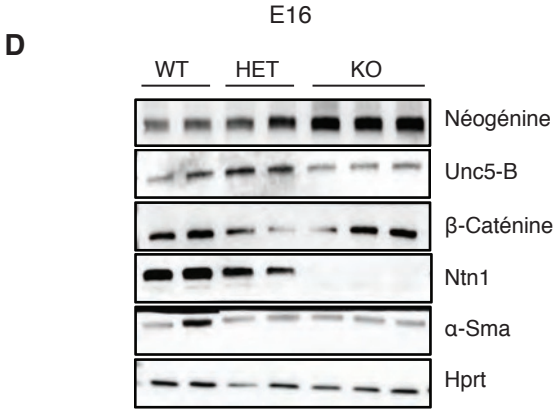
Afin de déterminer si la Nétrine-1 est nécessaire au développement de l'intestin grêle, les intestins d'embryons *EIIaCre*$^{+}$; *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ ont été prélevés aux stades embryonnaires E13.5, E16 et E18. La coloration HPS de ceux-ci montre qu'au stade E13.5 aucun phénotype évident n'est observé (n=3). Au stade E16 un important défaut ou retard de développement de l'épithélium intestinal est constaté **(Figure 29A)**. En effet la plupart des mutants *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ présentent un épithélium pluristratifié relativement plat et épais ainsi que très peu de villi, en comparaison aux contrôles. Néanmoins, de façon très surprenante la pénétrance de ce phénotype n'est pas de 100%. Celui-ci a en effet été observé chez 4 embryons mutants sur 7 mais n'a cependant jamais été observé chez les embryons contrôles. À E18, les mutants *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ présentent un épithélium intestinal semblable en apparence à celui des individus contrôles (n=3) **(Figure 29A)**. Ces observations suggèrent ainsi que la perte précoce de Nétrine-1 dans l'intestin induit un retard, plutôt qu'un défaut d'émergence des villi. La visualisation par immunomarquages des différents types cellulaires constituant les villi à E18 permettrait toutefois d'apporter des informations sur la fonctionnalité de l'épithélium intestinal des embryons *KO Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$.

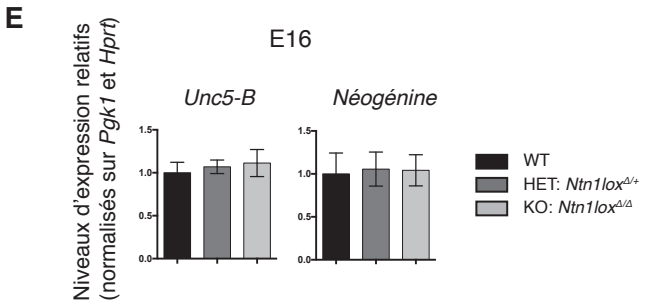
Notons que le retard de développement observé de l'épithélium intestinal ne semble pas résulter d'un retard de développement global des embryons *KO*, aucune différence de taille n'ayant été observée en comparaison aux embryons contrôles. Enfin, la perte précoce de Nétrine-1 ne semble pas altérer les mécanismes régissant la croissance en longueur de l'intestin grêle. Les longueurs mesurées entre individus contrôles et mutants aux stades E16 et E18 n'apparaissent pas significativement différentes **(Figure 29B)**.

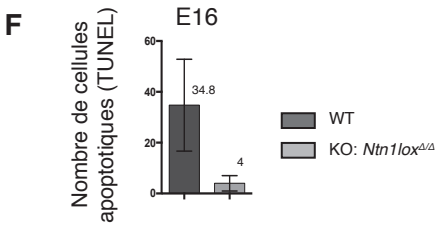
À E16, les individus *KO Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ présentant un retard de développement de l'épithélium intestinal ne montrent pas d'altération de localisation des cellules α-Sma^{+} (cellules sécrétant potentiellement la Nétrine-1), ni d'altération du niveau d'expression de ce marqueur **(Figure 29C et D)**. Chez ces individus, la mise en place du plexus myentérique, visualisé par le marqueur Pgp9.5, ne semble également pas affectée. Sur cet immunomarquage le plexus sous-muqueux n'est visualisé ni chez les individus contrôles ni chez les individus mutants, par manque de sensibilité probablement **(Figure 29C)**. De façon similaire la localisation et le niveau d'expression de la β-Caténine, ainsi que le taux de prolifération visualisé par un marquage Edu ne sont pas altérés par la perte de Nétrine-1 **(Figure 29C et D)**. De même, la membrane basale visualisée ici par un marquage anti-

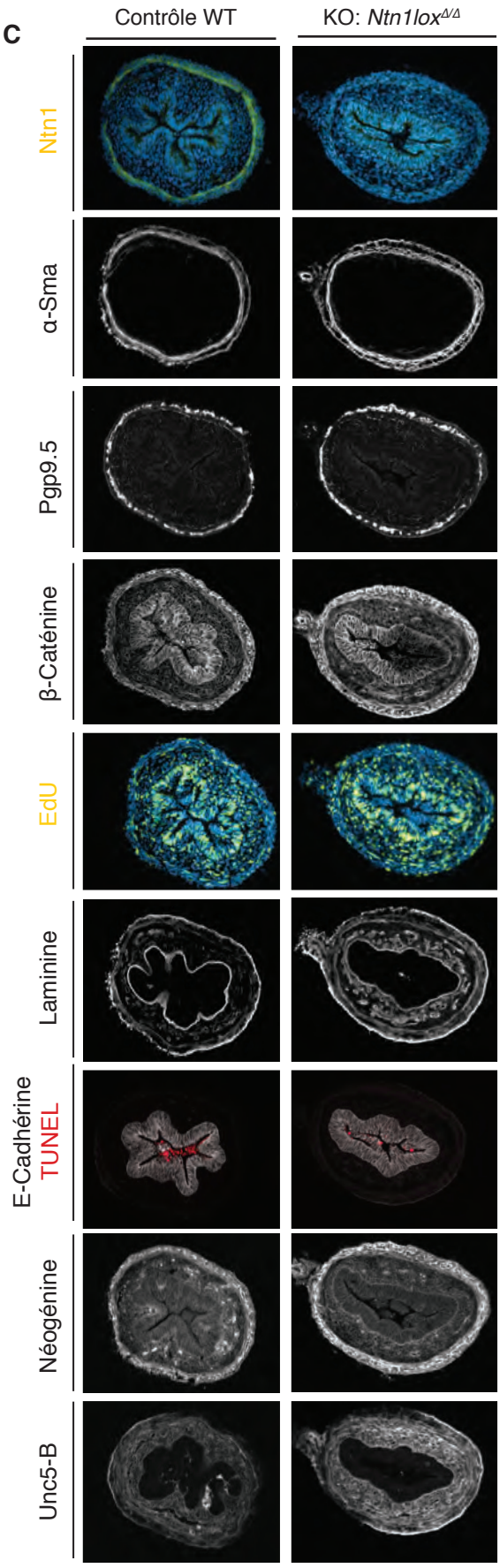

A
Contrôle WT
KO: Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$
E13.5
E16
E18


B
E16
E18
Longueur intestin grêle (cm)
3.4
3.13
3.2
6.5
6.1
6.1
WT
HET: Ntn1lox$^{\Delta/+}$
KO: Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$


D
E16
WT
HET
KO
Néogénine
Unc5-B
β-Caténine
Ntn1
α-Sma
Hprt


E
E16
Niveaux d'expression relatifs (normalisés sur Pgk1 et Hprt)
Unc5-B
Néogénine
WT
HET: Ntn1lox$^{\Delta/+}$
KO: Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$


F
E16
Nombre de cellules apoptotiques (TUNEL)
34.8
4
WT
KO: Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$


C
Contrôle WT
KO: Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$
Ntn1
α-Sma
Pgp9.5
β-Caténine
EdU
Laminine
E-Cadhérine
TUNEL
Néogénine
Unc5-B

laminine ne semble pas perturbée **(Figure 29C)**. Un marquage des intégrines serait néanmoins informatif, et permettrait d'investiguer si la perte de Nétrine-1 peut conduire à une perturbation de l'adhésion cellulaire de l'épithélium intestinal à la lame basale par exemple. Les marquages TUNEL révèlent un nombre de cellules apoptotiques considérablement diminué chez les individus *KO Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$* présentant un retard de développement de l'épithélium intestinal **(Figure 29C et F)**. Toutefois, chez les individus *KO Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$* ne présentant pas ce phénotype, le nombre de cellules TUNEL^{+} n'est pas altéré (données non présentées). Ces résultats suggèrent que dans ce contexte intestinal embryonnaire la Nétrine-1 ne semble pas agir comme facteur de survie. La diminution du nombre de cellules apoptotiques chez les individus *KO Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$* présentant un phénotype résulte probablement du retard de croissance de l'épithélium. En effet aux stades précoces de l'ontogénèse de l'épithélium intestinal le taux d'apoptose observé est quasiment nul. Celui-ci augmente avec la mise en place et la croissance des villi. La quantification du nombre de cellules apoptotiques par marquages TUNEL effectués sur coupes d'intestins d'embryons à E18 ne révèlerait probablement pas de différences entre les individus contrôles et les individus *KO Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$*.

Figure 29 : La perte précoce de la Nétrine-1 dans l'embryon retarde l'ontogénèse de l'épithélium intestinal et l'émergence des villi.

A. Marquages HPS (Hémotoxyline Phloxine Safran) d'intestins grêles aux stades embryonnaires E13.5, E16 et E18. Alors qu'au stade embryonnaire E13.5 les intestins grêles d'embryons invalidés pour la Nétrine-1 ne présentent aucun phénotype évident, au stade E16 ceux-ci présentent un retard de développement de l'épithélium intestinal se traduisant par un retard d'émergence des villi. À E18 ce retard n'est plus observé et l'épithélium intestinal forme des villi, de façon similaire aux contrôles.

B. Quantification de la longueur des intestins grêles. La perte de Nétrine-1 n'entraîne pas de diminution significative de la longueur des intestins grêles aux stades embryonnaires E16 et E18.

C. Immunomarquages d'intestins grêles au stade embryonnaire E16. La perte de Nétrine-1 ne semble pas affecter les cellules α-Sma^{+}, sources potentielles de cette protéine. Cette perte ne semble pas non plus altérer la mise en place du plexus myentérique (Pgp9.5), la prolifération (β-Caténine, Edu), ni même la lame basale (Laminine). Le retard de formation des villi observé chez certains individus Ntn1lox$^{\Delta/\Delta}$ est accompagné par une diminution du nombre de cellules apoptotiques (TUNEL). Le marquage E-Cadhérine permet de visualiser les cellules de l'épithélium intestinal. L'expression des récepteurs Néogénine et Unc5-B semble être augmentée par la perte de Nétrine-1.

D. Analyse des niveaux d'expression protéiques par Western Blot au sein d'intestins grêles à E16. L'absence de Nétrine-1 dans l'intestin semble augmenter le niveau d'expression du récepteur Néogénine, et diminuer à l'inverse celle du récepteur Unc5-B. Cette délétion n'affecte pas les niveaux d'expression de la β-Caténine ni du marqueur α-Sma.

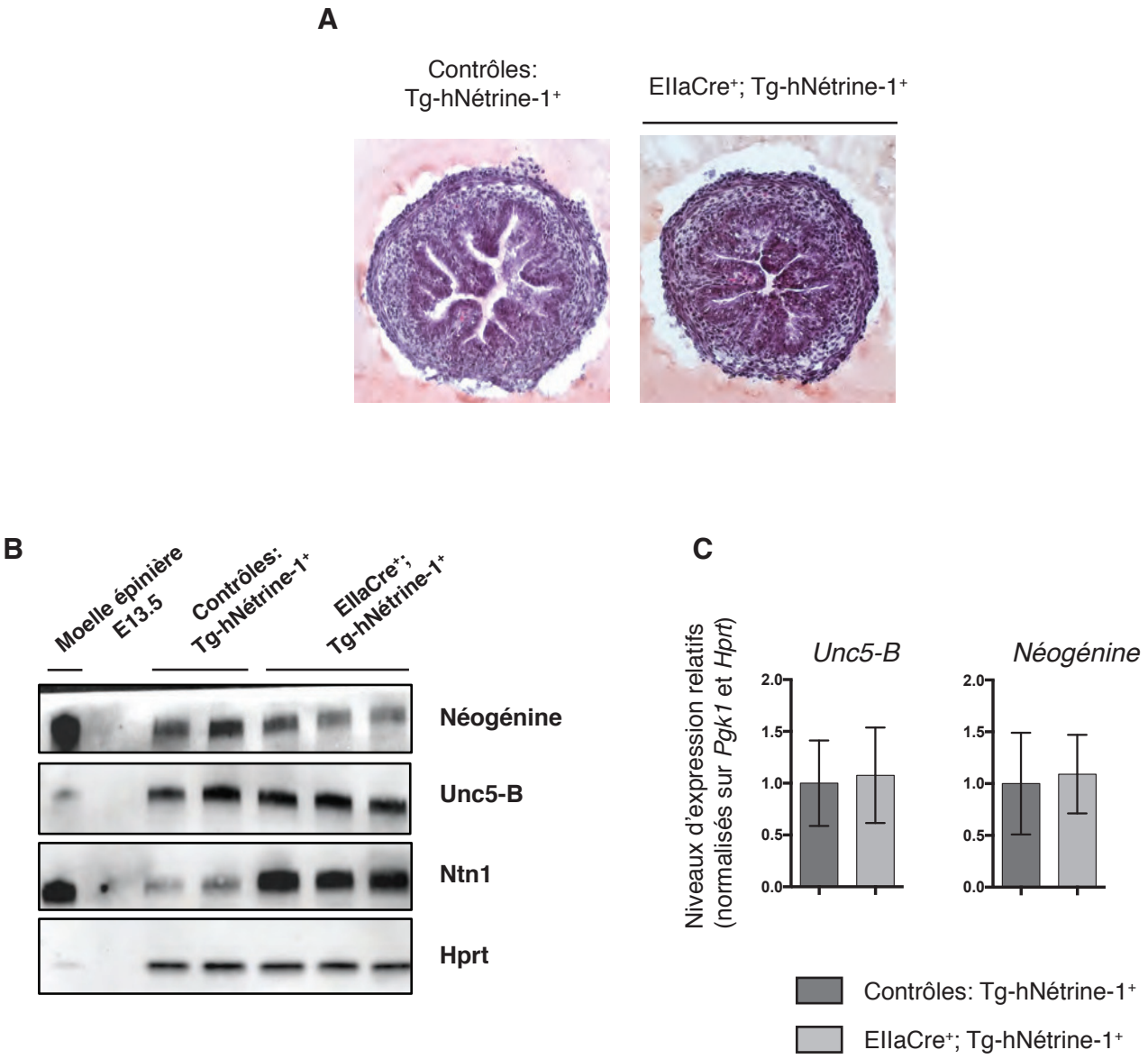
E. Analyse par RT-PCRq du niveau d'expression des récepteurs Unc5-B et Néogénine dans l'intestin grêle d'embryons KO Nétrine-1, au stade de développement E16. La délétion précoce de Nétrine-1 n'altère pas les niveaux d'expression transcriptionnels des récepteurs Unc5-B et Néogénine.

F. Quantification du nombre de cellules apoptotiques par marquage TUNEL. À E16 l'absence de villi dans l'épithélium intestinal des individus KO Nétrine-1 est accompagnée par une forte diminution du nombre de cellules apoptotiques en comparaison aux contrôles.

Afin de réellement mettre en évidence un retard d'émergence des villi nous aurions souhaité visualiser (1) la localisation des cellules mésenchymateuses et des clusters Pdgfr-α$^+$ desquels émergent les villi, ainsi que (2) la signalisation Hh, responsable de la mise en place de ces clusters, *via* le marquage des ligands Shh et Ihh, mais également *via* le marquage des facteurs de transcription Gli. Malheureusement les anticorps testés n'ont permis d'obtenir aucun immunomarquage satisfaisant.

Dans la moelle épinière en développement la perte de Nétrine-1 conduit à une augmentation d'expression protéique du récepteur Néogénine (Bin et al., 2015; Yung et al., 2015). Nous constatons qu'il en est de même dans l'intestin **(Figure 29C et D)** et constatons également que cette augmentation d'expression protéique ne résulte pas d'une augmentation d'expression transcriptionnelle **(Figure 29E)**. Les immunomarquages anti-Unc5-B réalisés sur l'ensemble des intestins d'individus KO *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ à E16 révèlent également une surexpression de ce récepteur en absence de Nétrine-1 **(Figure 29C)**. De façon surprenante cette observation n'est pas corroborée par l'analyse du niveau d'expression protéique de Unc5-B par Western Blot **(Figure 29C)**. En effet d'après cette technique la perte de Nétrine-1 semble à l'inverse diminuer l'expression du récepteur Unc5-B. Un second dépôt sur gel des échantillons apparaît donc nécessaire à confirmer ces observations. Il serait également intéressant d'investiguer le niveau d'expression protéique du marqueur CD31/PECAM, spécifique des cellules endothéliales du système vasculaire. En effet, le récepteur Unc5-B est fortement exprimé par ce système dans de nombreux tissus et le patron d'expression observé ici dans l'intestin embryonnaire pourrait correspondre à celui du système vasculaire intestinal.

Les résultats obtenus ici montrent que la Nétrine-1 semble jouer un rôle dans l'ontogénèse de l'épithélium intestinal et plus précisément dans l'émergence des villi. Si la perte d'expression de Nétrine-1 conduit à un retard de formation des villi, celle-ci ne semble néanmoins ni affecter la mise en place du plexus myentérique, ni affecter le taux de prolifération, ni perturber la lame basale. Les causes de ce retard de développement restent donc encore à identifier. La corrélation entre les taux d'expression protéiques des récepteurs à la Nétrine-1 et ce retard de développement de l'épithélium intestinal est également à déterminer.



<u>Figure 30 :</u> La surexpression précoce de Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire n'induit pas de phénotype évident à E16. Cette surexpression abaisse néanmoins le niveau protéique du récepteur Néogénine.

A. Marquages HPS. A E16 les intestins grêles d'embryons surexprimant de façon précoce et ubiquitaire la Nétrine-1 (*EIIaCRE*$^+$ *; Tg-hNétrine-1*$^+$) ne présentent pas de phénotype évident en comparaison aux contrôles.

B. Analyse par Western Blot des niveaux d'expression protéiques. A E16, la surexpression ubquitaire de Nétrine-1 dans l'intestin induit une diminution d'expression du récepteur Néogénine mais n'affecte pas celle du récepteur Unc5-B.

C. Analyse des niveaux d'expression des récepteurs *Unc5-B* et *Néogénine* par RT-PCRq. La surexpression de Nétrine-1 n'altère pas les niveaux d'expression transcriptionnel des récepteurs *Unc5-B* et *Néogénine*.

B. La surexpression de Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire module l'expression du récepteur Néogénine sans induire de conséquence phénotypique évidente à E15.5.

Afin de constater si la létalité embryonnaire des embryons surexprimant de façon précoce et ubiquitaire la Nétrine-1 est accompagnée d'un disfonctionnement intestinal, les intestins d'embryons *EIIaCre*$^{+}$ *; Tg-hNTN1*$^{+}$ prélevés au stade E15.5 ont été marqués par une coloration HPS **(Figure 30A)**. L'observation de celles-ci ne révèle aucun phénotype évident (n=6). Néanmoins chez les individus surexprimant la Nétrine-1 le niveau d'expression protéique du récepteur Néogénine est abaissé alors que celui du récepteur Unc5-B apparaît constant **(Figure 30B)**. Une fois encore cette régulation d'expression n'est pas observée au niveau transcriptionnel **(Figure 30C)**. Cette analyse très préliminaire de l'effet de la surexpression ubiquitaire de la Nétrine-1 sur le développement embryonnaire intestinal, nécessite maintenant d'être approfondie.

Lignée recombinase Cre	Spécificité dans l'intestin grêle	Inductible au tamoxifène
EIIa: Cre	Ubiquitaire	Non
Lgr5: CreERT2	Cellules souches intestinales CBC	Oui
Villin:CreERT2	Epithélium intestinal	Oui

Table 1 : Lignées murines de recombinases Cre utilisées

PROCEDURES EXPERIMENTALES

Lignées murines

Toutes les lignées murines ont été maintenues dans le fond génétique C57BL/6. L'ensemble des animaux a été hébergé et manipulé en accord avec les réglementations et législations de la plateforme AniCan du CRCL et du comité d'éthique local CECCAPP.

Lignée murine *Nétrine-1lox*

La génération du modèle murin de délétion conditionnelle de la Nétrine-1 (Ntn-1lox ou Nétrine-1lox) a été décrite par Dominici et al. en 2017 (Annexe1). Brièvement : deux sites LoxP ont été insérés de part et d'autre du 3ème exon du gène de la *Ntn1*, contenant le codon start initiateur ATG.

Lignée murine Rosa26-LSL-h*NTN1* ou Tg-hNétrine-1

La génération du modèle murin de surexpression conditionnelle de la Nétrine-1 a été réalisée par l'insertion du gène codant pour la Nétrine-1 humaine dans le locus ubiquitaire Rosa26, précédé d'une cassette stop transcriptionnelle : LoxP-Stop-LoxP. Après induction de la recombinaison Cre/Lox l'expression du transgène codant pour la Nétrine-1 humaine est placée sous le contrôle de l'activité promotrice endogène du locus Rosa26. Afin de se rapprocher au plus près des niveaux de surexpression de Nétrine-1 pouvant être observés in vivo dans certains cancers par exemple, il a été choisi de ne pas placer l'expression de la Nétrine-1 sous la dépendance d'un promoteur fort exogène. Cette lignée n'a actuellement encore pas été publiée.

Lignées recombinases Cre (Table 1)

La génération de modèles murins de délétion ou de surexpression ubiquitaire de la Nétrine-1 a été obtenue par les croisements respectifs des lignées murines *Nétrine-1lox* et Rosa26-LSL-*hNTN1* avec la lignée murine EIIA^{Cre} (Jackson Laboratories), exprimant la recombinase Cre de façon ubiquitaire, notamment dans les lignées germinales mâles et

femelles. La délétion précoce de la Nétrine-1 conduit à la mort des animaux dans les heures suivant leur naissance. La surexpression précoce de la Nétrine-1 induit une létalité embryonnaire aux alentours du stade de développement E16-E16.5.

La délétion ou la surexpression spécifique de la Nétrine-1 dans les cellules souches intestinales ainsi que dans l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal ont été obtenues par le croisement respectif des lignées murines Nétrine-1lox et Rosa26-LSL-*hNTN1* avec la lignée inductible Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 (Jackson laboratories) ou Villin-CreERT2 (El Marjou et al., 2004). La lignée murine Lgr5 : Cre exprime une recombinase CreERT2 inductible spécifiquement dans les cellules Lgr5^{+}, dont les CSI. Dans l'intestin, la recombinaison Cre/Lox est transmise à l'ensemble des cellules constituant l'épithélium intestinal bien que ces dernières n'expriment ni la CreERT2, ni la EGFP. La lignée murine Villin : CreERT2 exprime une recombinase CreERT2 inductible sous la dépendance du promoteur Villin, spécifique de l'ensemble des cellules de l'épithélium intestinal.
L'ensemble des lignées murines recombinases Cre ont été maintenues à l'état hétérozygote.

Lignée murine rapportrice Rosa26-LSL-tdTomato

La lignée murine rapportrice Rosa26-LoxP-Stop-LoxP-tdTomato (Jackson laboratories) a été croisée avec l'ensemble des lignées murines recombinases Cre utilisées afin de caractériser ces dernières, et de mettre au point les doses et fréquences d'injections de tamoxifène requises à l'activation de chacune d'entre elles.
Pour les stades de développement embryonnaires, le matin de l'observation du bouchon vaginal a été compté comme jour embryonnaire E0.5.

Injections de tamoxifène

Les animaux porteurs de la recombinase Lgr5-CreERT2 ont reçu une dose unique de 100mg/kg de tamoxifène, en injection intra-péritonéale, 4 semaines après leur naissance. Les animaux porteurs de la recombinase Villin-CreERT2 ont été injectés trois jours consécutifs avec 100mg/kg de tamoxifène, en injection intra-péritonéale, 4 semaines après leur naissance. Le tamoxifène (Sigma, T-5648) a été resuspendu en conditions stériles dans de l'huile de maïs (Sigma, C-8267) puis filtré sur filtre 0.2µm.

Comptage des cellules souches Lgr5-EGFP+

Afin de compter le nombre de cellules souches intestinales Lgr5-EGFP+ par crypte, un segment du jéjunum a été prélevé, lavé, coupé longitudinalement puis fixé sur la nuit à 4°C dans du paraformaldehyde 4% dilué dans du tampon phosphate 0.12M, pH 7.4. Les échantillons de tissus entiers ont ensuite été incubés dans une solution de PBS1X, 2% BSA, 30 minutes à température ambiante. Ils ont ensuite été incubés avec l'anticorps primaire anti-Epcam couplé Apc (Allophycocyanine) (1 :100 ; Affymetrix ebioscience, 17-5791-82) dans une solution de PBS 1X, 0.5% Triton-100X pendant 48 heures à température ambiante, afin de visualiser le contour de chaque cellule épithéliale. Enfin les échantillons ont été contremarqués avec du Hoechst 33342 (1:3000, ThermoFisher) et montés entre lame et lamelle en plaçant la lumière du tube digestif contre la lame et la séreuse contre la lamelle. La base des cryptes a ainsi été observée en traversant séreuse et musculeuse grâce à un microscope confocal Zeiss 780. Le nombre de cellules souches Lgr5-EGFP+ a été compté au sein de six cryptes par individus.

Immunomarquages

Après prélèvements les échantillons ont été fixés sur la nuit à 4°C dans du paraformaldehyde 4% dilué dans du tampon phosphate 0.12M, pH 7.4. Après fixation, ceux-ci ont été incubés 3 heures à température ambiante dans une solution de sucrose 10% diluée dans du tampon phosphate 0.12M ph7.4, puis une nuit à 4°C dans une solution de sucrose 30% diluée dans du tampon phosphate 0.12M pH7.4. Les échantillons ont ensuite été inclus dans une solution de gélatine 7.5%/sucrose 10% resuspendue dans du tampon phosphate 0.12M pH7.4, congelés à -45°C dans de l'isopentane puis coupés au cryostat avec une épaisseur de 12µm. Pour les contrôles positifs de moelle épinière d'embryons au stade E13.5, des coupes de 20µm ont été réalisées.

Les immunofluorescences ont été initiées par une étape de saturation des sites antigéniques par immersion des coupes dans une solution de PBS 1X, 0.2% gélatine, 0.25% triton (PBS-GT) pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants, dilués dans du PBS-GT : anti-Nétrine-1 de lapin (1:100, Abcam ab126729) ; anti-robo3 de chèvre (1 :500 ; R&D Systems, AF3076); anti-Dcc de chèvre (1 :500; Santa Cruz, SC6535) ; anti-Unc5-B de souris (1 :100, Abcam, ab54430) ; anti-Néogenine de chèvre (1 :100, Santa Cruz, SC6536) ; anti-α-sma de souris (1 :250, Abcam, ab7817) ; souris anti-β-Caténine (1 :100, BD Transduction Laboratories™, 610153) ; anti-E-

Cadhérine de souris (1 :100, BD Transduction Laboratories™, 610181) ; anti-Laminine de lapin (1 :400, Abcam, ab11575); anti-Pgp9.5 de souris (1 :500, Abcam, ab8189). Après trois rinçage en PBS les coupes ont été incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire spécifique de l'espèce utilisée (1:400) couplé à un fluorochrome (Alexa-488, Cy-3, Alexa-647 from Jackson ImmunoResearch) ainsi qu'avec du Hoechst 33342 (1:3000, ThermoFisher). Pour les immunomarquages anti-Nétrine-1, anti-Unc5-B, anti-Néogenine un démasquage antigénique a été effectué préalablement à l'étape de blocage. Pour ce faire, les coupes ont été immergées pendant 20 minutes dans du tampon citrate pH6, 0,1% triton porté à ébullition.
L'acquisition des images a été réalisée sur un microscope Zeiss AxioImager.

Les marquages Hématoxyline Phloxine Safran (HPS) ont été réalisés sur un automate du CRCL.

Marquages TUNEL (Terminal déoxynucleotidyl transférase dUTP Nick End Labelling)

Après avoir été rincées dans du PBS, les coupes de tissus ont été soumises à une étape de perméabilisation dans une solution de PBS 1X, 0.2% Triton X-100 pendant 15 minutes à température ambiante. Rincées de nouveau dans du PBS 1X elles ont ensuite été pré-incubées 5 minutes à température ambiante dans le tampon de réaction Tdt (terminal déoxynucléotidyl transférase) contenant 30 mM de Trizma base (pH 7,5), 150 mM de cacodylate de sodium et 1mM de chlorure de cobalt ($CoCl_2$). Puis celles-ci ont été incubées 1 heure à 37°C avec des dUTP-biotynilés (Biotin-16-dUTP; Roche) et l'enzyme TUNEL terminal déoxynucléotidyl transférase (Tdt ; Roche) dans le tampon de réaction Tdt. La réaction a finalement été arrêtée par immersion des coupes dans du tampon TB contenant 300 mM de chlorure de sodium et 30 mM de citrate de sodium, 15 minutes à température ambiante. Après 3 rinçages en PBS, une étape de blocage de sites antigéniques a été réalisée dans du PBS 1X, BSA 2%, 10 minutes à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées avec de la streptavidine couplée Cy3 (1:1000) diluée dans du PBS, 1 heure à température ambiante. Enfin, un contre marquage a été réalisé avec du Hoechst 33342 (1:3000) et les analyses effectuées avec un microscope à fluorescence (Zeiss AxioImager).

Gènes	Amorces	Séquences 5' → 3'
hNétrine-1	sens	AAAAGTACTGCAAGAAGGACTATGC
	antisens	CCTGCTTATACACGGAGATG
Nétrine-1	sens	CCCTTGCATCAAGATTCCTGTG
	antisens	CTTCATGTTCATCTTCAGCTTGCC
Dcc	sens	AGCCAATGGGAAAATCACTGCTTA
	antisens	AAGGCTGAGATCCATGATCTGATG
Unc5-A	sens	CATCACTAAGGACACGAGGTTTGC
	antisens	GGCTGGTAATGATCTTTTGCCGAA
Unc5-B	sens	AACTACTGGCCAAGTACCAGGAGA
	antisens	GACCTTACAGGTGAACTCCGTG
Unc5-C	sens	CAAATTGCTGGCTAAGTATCAGGAA
	antisens	TTCCACTGTGTTTAGGCTGAGTCTT
Néogénine	sens	CCATCTAGCACCAGCCACAA
	antisens	TTCTCAACACGCTCCCTAGC
Lgr5	sens	CTTCACTCGGTGCAGTGCT
	antisens	CAGCCAGCTACCAAATAGGTG
Smoc2	sens	CGTGGGAATTGCAAAGATG
	antisens	CCTGCTCCTGGGTATACTTCC
Olfm4	sens	CTCCGGGAGGCACTTCTT
	antisens	CTGTCCACAGACCCAGTGAA
Bmi1	sens	CAAAACCAGACCACTCCTGAA
	antisens	TCTTCTTCTCTTCACTCATTTTTGA
Lys1	sens	GTCACACTTCCTCGCTTTCC
	antisens	TGGCTTTGCTGACTGACAAG
Ki67	sens	CCCACTTCTGGGGATCTCTT
	antisens	TCGGTTCCCTGT AACTGCTC
Alpi	sens	GCCTATCTCTGTGGGGTCAA
	antisens	TTTCTTGGCACGGTACATCA
ChgA	sens	AAGGTGATGAAGTGCGTCCT
	antisens	GGTGTCGCAGGATAGAGAGG
Muc2	sens	CCGACTTCAACCCAAGTGAT
	antisens	GAGCAAGGGACTCTGGTCTG
Pgk1	sens	CACCGAGCCCATAGCTCCAT
	antisens	CTGCAACTTTAGCGCCTCCC
Hprt	sens	CCAGCGTCGTGATTAGCGAT
	antisens	GCCACAATGTGATGGCCTCC

Table 2 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées en PCRq.

Marquages Edu (5-ethynyl-2-deoxyuridine)

45 minutes avant leur mise à mort, les femelles gestantes ont reçu 1mg d'Edu dilué dans du PBS, en injection intra-péritonéale. Les cellules prolifératives des intestins grêles embryonnaires ont ensuite été visualisées grâce au kit Alexa Fluor 488 Click-iT EdU Imaging (Invitrogen), selon les instructions du fournisseur.

Extraction des ARN, synthèse des ADNc et PCR quantitative en temps réel

Les ARN totaux d'intestins ont été extraits avec le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel), et ceux des organoïdes avec le RNeasy Micro kit (Qiagen), selon les recommandations des fournisseurs. La synthèse des ADNc a ensuite été réalisée sur 500 ng d'ARN totaux par la transcriptase inverse iScript cDNA Synthesis kit (BIO-RAD) et les différents gènes d'intérêts amplifiés par PCR quantitative en temps réel avec le kit Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche) sur un LighCycler 480 Instrument (Roche). Chaque échantillon a été analysé en duplicat. Les niveaux d'expression ont été normalisés sur les gènes de ménage *Hprt* et *Pgk1*. Les séquences des amorces utilisées sont présentées en **Table 2**.

Western Blots

Les échantillons d'intestins totaux ont été lysés dans du tampon RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 1% NP-40, 0.5% désoxycholate de sodium, 0.1% SDS) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche) et des cocktails d'inhibiteurs de phosphatases 2 et 3 (Sigma). Ceux-ci ont ensuite été soumis à 10 pulses de sonication, d'amplitude 10%, sur glace, dans le tampon de lyse RIPA.
Après avoir déterminé leurs concentrations avec le kit Pierce BCA Protein Assay (Thermofisher), 18µg de protéines totales on été déposés sur un gel d'électrophorèse pré-coulé à 4-15% Mini Protean TGX (BIO-RAD), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (BIO-RAD). Après une étape de saturation dans une solution TBS-0,1% Tween (TBS-T), 5% lait, 3% BSA pendant 1 heure à température ambiante, les membranes ont été incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants: anti-Nétrine-1 de lapin (1:1000, Abcam, ab126729); anti-Unc5-B de lapin (1:1000; Cell Signaling, 13851) ; anti-Néogénine de chèvre (1 :1000, Santa Cruz, SC6536) ; anti-Dcc de chèvre (1 :1000; Santa Cruz, SC6535) ; anti-α-sma de souris (1 :500, Abcam, ab7817) ; anti-β-Caténine de souris (1 :200, MerckMillipore, 05-665); anti-HPRT de lapin (1 :10000, Abcam, ab109021). Celles-ci

ont ensuite été lavées trois fois en TBS-T puis incubées avec l'anticorps secondaire correspondant à l'espèce utilisée couplé HRP (1:5000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). Les protéines d'intérêts ont finalement été révélées grâce au substrat SuperSignal west Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher).

Cultures d'organoïdes intestinaux adultes ex vivo

Les cultures d'entéroïdes adultes ont été réalisées selon la méthode publiée par Sato et al. en 2009 (Sato et al., 2009). Brièvement, après avoir été lavés, les intestins ont été découpés en petits morceaux, puis incubés 30 min sur glace dans une solution de PBS 1X, 2mM EDTA. Les cryptes ont ensuite été séparées des villi par des étapes successives de cassages mécaniques (pipetage/refoulage) et de centrifugations. La fraction enrichie en cryptes a ensuite été filtrée sur un filtre de 40µm, centrifugée puis resuspendue dans du milieu DMEM F12/Glutamax. Les cryptes ont ensuite été incorporées dans du Matrigel (Corning) en proportions 1 :1, déposées sous forme de goutte dans des plaques de culture et placées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 et 85% d'humidité. Après 35 minutes d'incubation le milieu de culture contenant 1/50 de B27 (Gibco®, 17504044), 50 ng/ml de Noggin (Prepotech, 250-38), 250ng/ml de R-Spondin1 (R&D Systems, 3474-RS), 20 ng/ml d'Egf (Sigma, E4127) et 10 ng/ml de Fgf (R&D Systems, 3139-FB-025) dilués dans DMEM F12/Glutamax a été ajouté par dessus les gouttes de Matrigel. Le milieu de culture a été remplacé tous les 2 jours.

Les organoïdes sauvages ont été traités avec 900 ng/ml de Nétrine-1 (Adipogen, AG-40B-0075) ajoutés au milieu de culture dès le Jour 0 (Jour de mise en culture). La Nétrine-1 recombinante a ensuite été ajoutée au milieu de culture à chaque changement de milieu, *i.e* tous les 2 jours. Le vehicle de la Nétrine-1 est l'eau.

Les organoïdes Villin : CreERT2 ; Tg-hNétrine-1 ont été traités avec 150 nM de 4-OHT (Sigma T176) ou de vehicle (Ethanol 100%), ajoutés au milieu de culture à Jour 0. 24h post traitement le milieu de culture a été remplacé et le 4-OHT retiré.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Profils d'expression de la Nétrine-1 et de ses récepteurs dans l'intestin grêle en développement et adulte.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont montré que l'expression de la Nétrine-1 dans l'intestin grêle est détectée dès les stades précoces de développement et perdure tout au long de la vie. Néanmoins, le niveau d'expression de cette protéine s'est révélé variable au cours du temps et dépendante du stade de développement. La Nétrine-1 est ainsi bien plus fortement exprimée lors des stades prénataux que chez l'adulte. De façon intéressante, mes résultats ont également permis de mettre en évidence une expression différentielle des récepteurs Dcc, Néogénine et de la famille des Unc5 au cours du développement et chez l'adulte. En effet si les niveaux d'expression de Dcc et Unc5-C sont plus importants aux stades embryonnaires que chez l'adulte, à l'inverse ceux des récepteurs Unc5-A et –B apparaissent plus élevés chez l'adulte. Le récepteur Néogénine arbore quant à lui une expression relativement élevée et constante à partir du stade embryonnaire E17. Compte tenu de ces observations, la Nétrine-1 pourrait donc jouer plusieurs rôles dans l'intestin, dépendants du ou des récepteurs engagés et du stade de développement considéré. L'investigation de ces différents rôles nécessite toutefois de déterminer avec précision les profils d'expression de chacun de ces récepteurs mais également de préciser celui de la Nétrine-1, en particulier chez l'adulte.

A. La Nétrine-1 : une molécule sécrétée par les cellules du mésenchyme ?

Dans l'intestin embryonnaire, l'expression de la Nétrine-1 est particulièrement concentrée au niveau de la zone externe du mésenchyme et semble co-localiser avec l'expression du marqueur α-Sma. Afin de déterminer si les cellules α-Sma$^+$ de la couche musculeuse, encore immature à ce stade, sont effectivement la ou une source intestinale de Nétrine-1, j'ai récemment généré le modèle murin α-Sma :CreERT2 ; Nétrine-1lox. L'expression du marqueur α-Sma étant observée à partir du stade de développement E13, la recombinaison Cre/Lox a donc été induite à ce stade par injection intra-péritonéale de tamoxifène aux femelles gestantes. Les intestins fœtaux ont ensuite été prélevés au stade E16 et seront prochainement analysés afin de constater si la délétion de Nétrine-1 dans les cellules α-Sma$^+$ conduit effectivement à une diminution partielle ou une perte totale d'expression de cette protéine.

Chez l'adulte nous avons constaté que le signal obtenu pour la Nétrine-1 en immunomarquage est bien plus faible que chez l'embryon et que celui-ci semble localisé au niveau des cellules de la couche musculeuse ainsi que de la *lamina propria.* Il est donc envisageable, une nouvelle fois, que ce marquage co-localise avec les cellules α-Sma$^+$ qui, chez l'adulte constituent une population cellulaire hétérogène composée de : cellules de la musculeuse, myofibroblastes sous-épithéliaux (ISEMFs), cellules souches mésenchymateuses, péricytes ainsi que de cellules de la *muscularis mucosae*. Cette hypothèse est par ailleurs confortée par l'analyse du transcriptome des myofibroblastes sous-épithéliaux adultes (Ootani et al., 2009) qui révèle un niveau d'expression de Nétrine-1 au sein de cette population cellulaire, supérieur à celui de Wnt2b. Pour valider la spécificité de notre immunomarquage et déterminer si les cellules α-Sma$^+$ sont effectivement une source de Nétrine-1, de nouveaux immunomarquages anti-Nétrine-1 seront effectués chez des animaux adultes invalidés pour le gène *Ntn1* de façon ubiquitaire ou spécifiquement dans les cellules α-Sma$^+$. Ceux-ci seront réalisés grâce aux modèles murins Rosa26 :CreERT2 ; Nétrine-1lox et α-Sma : CreERT2 ; Nétrine-1lox respectivement. Si la spécificité du marquage anti-Nétrine-1 est validée et si la co-expression des protéines α-Sma et Nétrine-1 est confirmée il apparaîtra alors nécessaire d'appréhender l'expression de la Nétrine-1 spécifiquement au sein des différentes sous populations cellulaires α-Sma$^+$. Les péricytes pourront par exemple être isolés *via* les marqueurs Ng2 et Pdgfr-β et les myofibroblastes sous-épithéliaux *via* les marqueurs Vimentine et Thy-1.

Face aux difficultés rencontrées pour visualiser la Nétrine-1 au sein de la plupart des tissus adultes, dont l'intestin, il serait nécessaire de générer un modèle murin Nétrine-1 : EGFP, rapporteur de l'activité promotrice de ce gène. Un tel modèle permettrait en effet de s'affranchir de certaines difficultés techniques, manque de sensibilité et/ou aspécificités relatives aux techniques d'immunomarquages, d'hybridations *in situ* ou encore de révélation de l'activité β-galactosidase proposée par le modèle murin Ntn1-LacZ.

B. L'établissement des profils d'expression des récepteurs à la Nétrine-1 dans l'intestin grêle fœtal et adulte : vers une meilleure compréhension des mécanismes orchestrés par cette molécule.

Les résultats préliminaires obtenus par RT-PCRq ont montré qu'à chaque stade de développement considéré (du stade embryonnaire E13.5 jusque chez l'adulte) plusieurs récepteurs à la Nétrine-1 sont exprimés dans l'intestin grêle. Ceci nous amène donc à penser qu'outre son rôle attractif des cellules dérivées des crêtes neurales exprimant Dcc (Jiang et al., 2003), la Nétrine-1 pourrait être impliquée dans d'autres processus cellulaires, faisant intervenir d'autres récepteurs et d'autres types cellulaires. Afin de comprendre lesquels, il apparaît nécessaire d'établir avec précision les profils d'expression de chaque récepteur, au cours du développement et chez l'adulte.

Dans l'intestin embryonnaire nos immunomarquages ont mis en évidence une expression du récepteur Unc5-B restreinte au mésenchyme et pouvant éventuellement coïncider avec le réseau vasculaire ou le réseau lymphatique. Des immunomarquages anti-CD31 (système vasculaire) et anti-Vegfr-3 (système lymphatique) seront donc réalisés afin de déterminer si l'expression de Unc5-B colocalise effectivement avec l'un ou l'autre de ces réseaux et si celle-ci est exclusive. Il est fort probable que l'expression de ce récepteur co-localise en partie avec celle du système vasculaire puisque comme nous l'avons abordé en introduction Unc5-B est exprimé à la surface des cellules endothéliales appelées « tip cells » (Lu et al., 2004), (Larrivée et al., 2007). Si tel est le cas, se poseront alors les questions de savoir si le rôle du récepteur Unc5-B dans la mise en place et le maintien du système vasculaire de l'intestin embryonnaire est dépendant de la Nétrine-1 et s'il peut influer sur le développement de l'épithélium intestinal ? Pour y répondre, il sera nécessaire d'étudier les conséquences d'une délétion conditionnelle de Unc5-B sur l'ontogénèse intestinale au stade embryonnaire E16. La délétion du récepteur Unc5-B sera induite au stade embryonnaire E13.5 par exemple, afin d'éviter la létalité observée au stade E12.5 résultant de la délétion précoce et constitutive de ce récepteur.

Concernant le récepteur Néogénine, nos résultats ont permit de mettre en évidence une expression relativement ubiquitaire présentant une forte concentration au niveau des couches les plus externes du mésenchyme ainsi qu'à la base de l'épithélium. Ce profil d'expression nous laisse supposer qu'une des fonctions du récepteur Néogénine pourrait être la mise en place du SNE ou le maintien de son intégrité. Toutefois comme nous l'avons observé *via* l'immunomarquage anti-Pgp9.5, la perte complète de Nétrine-1 dans l'intestin embryonnaire ne semble pas affecter le plexus myentérique du système nerveux entérique.

L'absence d'anticorps suffisamment sensibles et spécifiques aux récepteurs Unc5-A et -C ne nous a malheureusement pas permit d'appréhender les profils d'expression de ces récepteurs par immunomarquages. De plus, tout comme les immunomarquages anti-Nétrine-1 les immunomarquages anti-Unc5-B et anti-Néogénine se sont révélés plus complexes chez l'adulte et les résultats obtenus plus ambigus. Pour approcher les profils d'expression des principaux récepteurs à la Nétrine-1 nous avons donc envisagé d'étudier ceux-ci par hybridations *in situ* et avons cloné des sondes spécifiques des récepteurs Néogénine, Unc5-A, -B et –C. Celles-ci ont récemment été validées sur coupes de cerveaux embryonnaires. Les hybridations *in situ* sur coupes d'intestin grêle seront donc prochainement réalisées. Néanmoins compte tenu de la difficulté à détecter la Nétrine-1 par cette technique, tant dans l'intestin embryonnaire qu'adulte, la méthode plus sensible de RNAscope® serait peut être à envisager.

Enfin, dans le but de déterminer avec précision quels récepteurs à la Nétrine-1 sont exprimés par l'épithélium intestinal adulte et plus précisément par les CSI et par les cellules de Paneth, nous pourrions isoler chacune de ces populations cellulaire par cytométrie en flux grâce au modèle murin Lgr5 :CreERT2 ; Rosa26-LSL-tdTomato. Ce modèle nous permettrait en effet dans un premier temps d'isoler les cellules de l'épithélium intestinal des autres cellules, sur la base de l'expression du rapporteur tdTomato. Puis, parmi cette population épithéliale tdTomato^{+}, les CSI Lgr5-EGFP^{+} pourraient être isolées *via* l'expression du rapporteur EGFP, et les cellules de Paneth EGFP^{-}, isolées sur la base de la co-expression des marqueurs Lysozyme et Dll4 par exemple. L'expression des récepteurs à la Nétrine-1 pourrait ainsi être investiguée par RT-PCRq au sein de ces différentes sous populations triées.

Les myofibroblastes sous-épithéliaux constituant une population indispensable à la niche des CSI ainsi qu'une source potentielle de Nétrine-1, une meilleure connaissance des statuts d'expression des récepteurs à la Nétrine-1 au sein de cette population cellulaire serait également nécessaire. De façon similaire à ce que nous venons de proposer, l'expression des récepteurs à la Nétrine-1 dans cette population cellulaire pourrait être étudiée par RT-PCRq après avoir isolé celle-ci par microdissection ou par tri cellulaire, sur la base du panel d'expression α-Sma^{+}, Vimentin^{+}, Thy-1^{+}, Desmin^{low} par exemple.

La Nétrine-1 étant une molécule bifonctionnelle, l'établissement des statuts d'expression précis de ses différents récepteurs au sein des populations cellulaires impliquées dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal apparaît nécessaire. Il est en effet envisageable que la Nétrine-1 puisse jouer différents rôles en fonction des

récepteurs engagés. Dans le SNC en développement par exemple, la Nétrine-1 exerce un effet attractif sur les neurones exprimant le récepteur Dcc, alors qu'elle exerce un effet répulsif sur ceux exprimant les récepteurs Dcc et Unc5 de façon concomitante (Keino-Masu et al., 1996), (Hong et al., 1999).

II. La Nétrine-1 : une molécule impliquée dans l'ontogénèse de l'épithélium intestinal ?

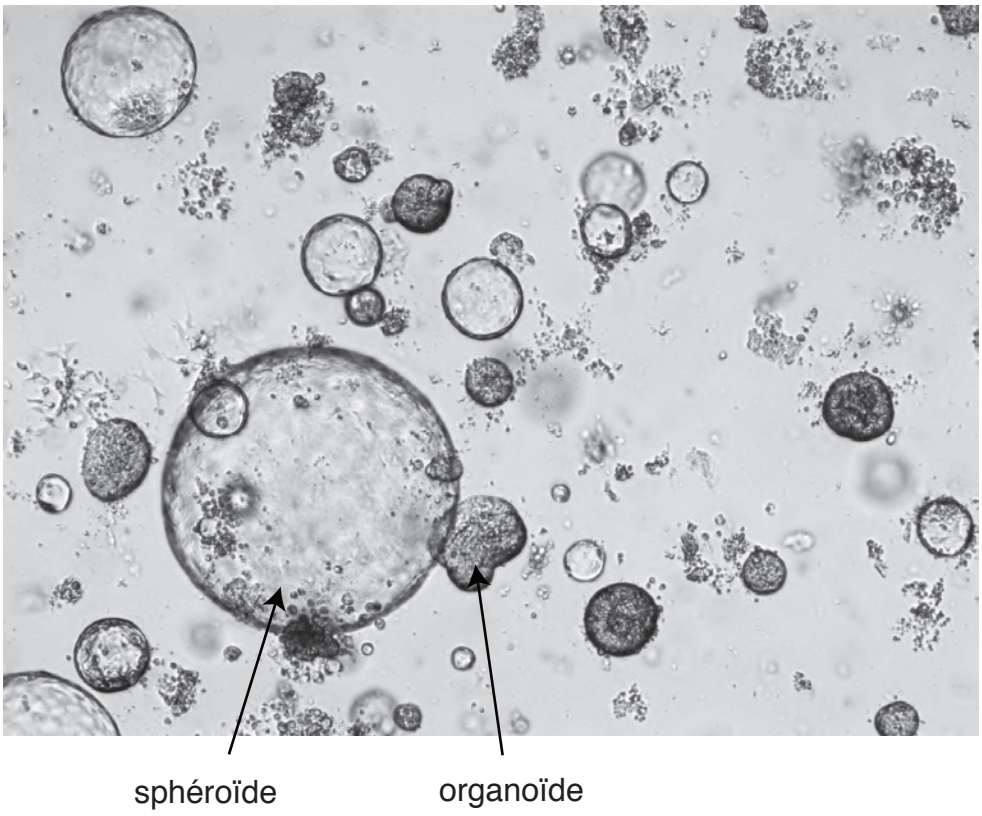
L'invalidation précoce et ubiquitaire de la Nétrine-1 dans l'embryon entraîne un retard de développement de l'épithélium intestinal caractérisé par un retard d'émergence des villi. Ce retard de développement, observé au stade embryonnaire E16, semble être rapidement compensé puisqu'au stade E18 les villi apparaissent normaux. Nous proposons ici que cette compensation puisse être le fruit d'une redondance d'expression de différentes Nétrines au sein de l'intestin embryonnaires. En effet les Nétrine-3 et -4 semblent également être exprimées par le mésenchyme intestinal de l'embryon (Li et al., 2007, GSE6383). Ces phénomènes de redondance et de compensation ne sont d'ailleurs pas rares dans l'intestin prénatal. À titre d'exemple l'invalidation unique et indépendante des facteurs de transcription Gata4 et Gata6 n'entraîne aucune perturbation des processus de morphogénèse épithéliale et de cytodifférenciation. Toutefois, l'invalidation concomitante de ces deux facteurs conduit à la formation de villi présentant à E18.5 des altérations histologiques importantes puis à la mort des individus double *knock-out* dans les 24h suivant leur naissance (Walker et al., 2014). Ces redondances d'expression des Nétrines pourraient également constituer une explication plausible à la pénétrance incomplète du retard de croissance observé au niveau de l'épithélium intestinal des individus *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$. Pour appuyer cette hypothèse il serait nécessaire d'une part, de définir avec précision les profils d'expression des autres Nétrines dans l'intestin grêle en développement, et d'autre part d'étudier les conséquences d'un triple *knock-out Ntn-1,-3,-4* par exemple.

À ce jour, nos résultats ne nous ont pas permis d'identifier les mécanismes impliqués dans le retard de développement de l'épithélium résultant de la perte de Nétrine-1. Afin d'appréhender ceux-ci et de renforcer nos résultats préliminaires, plusieurs expériences sont à envisager. Dans un premier temps, une expérience de séquençage ARN (RNA seq) réalisée chez les mutants invalidés pour le gène *Ntn1* permettrait d'identifier les voies de signalisations affectées à un niveau transcriptomique par la perte de Nétrine-1. Dans un second temps, l'intégrité de l'épithélium intestinal des individus *Ntn1lox*$^{\Delta/\Delta}$ devra être

investiguée par immunomarquages des différentes populations cellulaires épithéliales, du stade embryonnaire E16 jusqu'à la naissance. En effet si les marquages HPS ont révélé qu'au stade E18 le retard de développement engendré par l'invalidation de Nétrine-1 semble avoir été compensé, nous ne pouvons nous engager sur l'intégrité et la fonctionnalité de cet épithélium.

Finalement, la preuve absolue de l'implication de la Nétrine-1 dans l'ontogénèse de l'épithélium pourrait être apportée par un modèle murin permettant d'invalider celle-ci de façon ubiquitaire et constitutive tout en offrant la possibilité d'exprimer la Nétrine-1 humaine spécifiquement dans l'épithélium intestinal *via* une recombinase Cre inductible. Un tel modèle permettrait de constater si la production autocrine de Nétrine-1 par les cellules épithéliales suffit à restaurer le retard de croissance observé chez les KO Nétrine-1. Un modèle Ntn1-LacZ ; Villin : CreERT2 ; Rosa26-LSL-hNTN1 pourrait ainsi être envisagé. Bien que le modèle Ntn1-LacZ soit un modèle hypomorphe celui-ci semble toutefois plus adapté à la délétion ubiquitaire de la Nétrine-1 qu'un modèle Ntn1-DTR, exprimant le récepteur à la toxine diphtérique dans le locus *Ntn1*. En effet dans ce dernier modèle le traitement des souris par de la toxine diphtérique conduirait à la mort des cellules exprimant la Nétrine-1. Ne connaissant actuellement pas le profil d'expression précis de la Nétrine-1, il est envisageable que ce traitement conduise donc à la mort de cellules sources de Nétrine-1 mais également sources d'autres facteurs indispensables au développement de l'intestin. Le phénotype que nous observerions ne refléterait ainsi pas uniquement les conséquences de la perte de Nétrine-1 mais les conséquences de la perte de type(s) cellulaire(s) exprimant une multitude de molécules, dont la Nétrine-1. Un modèle plus approprié serait par exemple un modèle EIIa^{Flippase} ;Nétrine-1Frt ; Villin :CreERT2 ; Rosa26-LSL-hNTN1 permettant d'éliminer la Nétrine-1 dans l'ensemble de l'embryon de façon constitutive et précoce, grâce au système de recombinaison Flippase/Frt, puis de ré-exprimer cette protéine dans les cellules de l'épithélium intestinal grâce au système Cre/Lox.
Par ailleurs, l'étude de modèles murins invalidés pour les différents récepteurs à la Nétrine-1 dans l'ensemble des types cellulaires constituant l'intestin, puis spécifiquement dans l'épithélium intestinal ou le mésenchyme devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes par les lesquels la Nétrine-1 participe au développement de l'épithélium intestinal.

Les données obtenues lors de notre étude ont montré que la Nétrine-1 était capable de moduler le niveau protéique de ses propres récepteurs sans affecter leur niveau transcriptionnel. Ainsi, alors que la perte de Nétrine-1 conduit à une augmentation protéique de Néogénine, sa surexpression entraîne à l'inverse une diminution de ce même récepteur.



<u>Figure 31 :</u> La culture *ex vivo* d'intestins fœtaux au stade embryonnaire E16 génère une population mixte de sphéroïdes et d'organoïdes.

Concernant le récepteur Unc5-B nos résultats se sont révélés discordants, ne nous permettant pas de conclure quant aux conséquences d'une perte de Nétrine-1 sur le niveau d'expression protéique de ce récepteur. En effet, alors que les expériences de Western Blots semblent indiquer que la perte de Nétrine-1 conduit à une diminution du taux de protéine Unc5-B, les immunomarquages anti-Unc5-B révèlent un marquage plus intense suggérant une augmentation d'expression de ce récepteur. Ces expériences devront donc être réitérées et nos résultats confirmés. Contrairement au récepteur Néogénine, la surexpression de Nétrine-1 dans l'intestin ne semble pas moduler le niveau d'expression du récepteur Unc5-B. Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes par lesquels la Nétrine-1 régule la disponibilité de ses récepteurs il serait intéressant de déterminer si la Nétrine-1 régule la stabilité protéique de ceux-ci ou si elle régule leur endocytose. La stabilité des récepteurs pourrait par exemple être appréhendée par Western Blots sur embryons délétés du gène *Ntn1* ou surexprimant le transgène *Ntn1* humain, traités *in utéro* avec des inhibiteurs de la traduction, tels que le cycloheximide, en association ou non avec des inhibiteurs du protéasome, tels que le MG-132. De façon similaire, le rôle de la Nétrine-1 sur l'internalisation de ses récepteurs et leur dégradation pourrait être testé par Western Blots sur des embryons traités avec des inhibiteurs de l'endocytose, tels que des inhibiteurs de la GTPase Dynamin, ainsi qu'avec des inhibiteurs de l'activité lysosomale comme la chloroquine par exemple.

Outre ces expériences menées *in vivo*, la culture d'organoïdes *ex vivo* pourrait également se révéler informative. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, l'intestin fœtal semble héberger deux populations distinctes de CSI : l'une Cnx43$^+$ diminuant en proportions au cours du développement jusqu'à disparaître à la naissance ; et l'autre Lgr5$^+$ augmentant au cours du développement. Mises en culture, les cellules Cnx43$^+$ génèrent des sphéroïdes qui pourraient refléter « un état précoce figé » de l'épithélium intestinal avant que le processus de villogénèse n'ait eu lieu (Mustata et al., 2013). Les cellules Lgr5$^+$ de l'épithélium intestinal fœtal génèrent pour leur part des organoïdes similaires à ceux générés par les cellules Lgr5$^+$ de l'épithélium intestinal adulte **(Figure 31)**. Au stade de développement embryonnaire E16, les populations Cnx43$^+$ et Lgr5$^+$ coexistent. La mise en culture de l'épithélium intestinal à ce stade de développement conduit ainsi à la génération de sphéroïdes et d'organoïdes dans des proportions avoisinantes 60% :40% respectivement (Mustata et al., 2013). Afin de déterminer si le phénotype observé chez les individus dépourvus de Nétrine-1 est associé à une altération du nombre de CSI Cnx43$^+$ et/ou Lgr5$^+$, nous pourrions envisager de réaliser des cultures d'épithéliums intestinaux issus d'animaux EIIa^{Cre} ; Nétrine-1lox au stade embryonnaire E16 et de quantifier le nombre de sphéroïdes et organoïdes formés. Ces cultures pourraient également être traitées par de la Nétrine-1

recombinante, au jour d'ensemencement, afin de constater si cet ajout permet de restaurer les proportions sphéroïdes :organoïdes. Enfin, des expériences d'immunomarquages et de Western Blots pourraient être réalisées sur de telles cultures, afin de constater si dans ce contexte *ex vivo* la modulation du niveau d'expression de Nétrine-1 régule la disponibilité des récepteurs Néogénine et Unc5-B au sein des cellules de l'épithélium intestinal.

III. La Nétrine-1, une molécule impliquée dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal adulte ?

A. Quelles stratégies expérimentales pour étudier le rôle de la Nétrine-1 dans l'intestin grêle adulte?

Aujourd'hui le ou les type(s) cellulaire(s) exprimant la Nétrine-1 dans l'intestin adulte restent à préciser. L'étude du ou des rôle(s) de cette molécule dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal adulte nécessite donc de réaliser des expériences de perte de fonction ubiquitaire dans un premier temps. La mise en place d'un modèle murin Rosa26 :CreERT2 ; Lgr5 : EGFP ; Nétrine-1lox pourrait ainsi permettre (1) d'invalider de façon conditionnelle la Nétrine-1 dans l'ensemble des types cellulaires constituant l'intestin adulte mais également (2) de déterminer si cette invalidation conduit à une altération du nombre de CSI Lgr5-EGFP^{+} par crypte.
De façon similaire à ce que nous proposions chez l'embryon, les conséquences de la perte de Nétrine-1 pourraient être abordées d'un point de vue transcriptomique tout d'abord, *via* la réalisation d'un RNA seq sur intestins d'animaux contrôles et dépourvus de Nétrine-1. En parallèle de cette analyse l'intégrité physiologique de l'épithélium intestinal serait également à étudier *via* la réalisation d'immunomarquages spécifiques des différents types cellulaires, ainsi que par le suivi du statut prolifératif de ce tissu par marquage Edu par exemple.

Pour renforcer cette étude, la délétion de Nétrine-1 pourrait être, dans un second temps, spécifiquement opérée au sein des cellules α-Sma^{+} afin de constater si celle-ci conduit aux mêmes conséquences qu'une invalidation ubiquitaire. Enfin, des co-cultures d'entéroïdes Lgr5 :EGFP et de myofibroblastes α-Sma :CreERT2 ;Nétrine-1lox$^{lox/lox}$ (Ootani et al., 2009) permettraient définitivement de conclure quant à l'implication de la Nétrine-1 sécrétée par les myofibroblastes sous épithéliaux dans la régulation du nombre CSI Lgr5-EGFP^{+} et de leur fonctions.

Dans le cas où ces délétions de Nétrine-1 conduiraient à un phénotype, nous chercherons à déterminer *via* quel(s) récepteur(s) la Nétrine-1 participe au maintien de l'homéostasie intestinale. L'étude de mutants invalidés de façon conditionnelle pour un ou plusieurs de ces récepteurs sera donc envisagée.

Notons toutefois qu'à l'instar de la protéine Wnt3a (Farin et al., 2012) il est envisageable qu'*in vivo* la perte de Nétrine-1 ne conduise à aucune perturbation de l'homéostasie intestinale de part la redondance d'expression des Nétrines. En effet de la même façon que dans l'intestin fœtal les Nétrines-3 et -4 semblent être exprimées dans l'intestin adulte. Une fois encore la génération d'un triple KO *Ntn-1, -3, -4* pourrait se révéler nécessaire.

B. Quels rôles pour la Nétrine-1 dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal adulte ?

In vivo, nos résultats ont montré que la surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal n'entrainait aucune altération évidente du compartiment souche. Néanmoins, cette surexpression semble conduire à une augmentation d'expression des marqueurs *Muc2* et *ChgA,* spécifiques des cellules sécrétrices de mucus et des cellules entéro-endocrines respectivement, sans pour autant affecter celle du marqueur *Alpi*, spécifique du lignage absorptif. Comme nous l'avons proposé un peu plus tôt dans la partie résultats, ces observations suggèrent que la Nétrine-1 pourrait participer à la régulation du niveau d'expression de certains marqueurs spécifiques de la population sécrétrice sans toutefois orienter la différenciation des cellules progénitrices TA vers le lignage sécréteur. Dans ce cas de figure, la Nétrine-1 agirait donc directement sur les cellules différenciées du lignage sécréteur plutôt que sur les CSI ou leur progéniteurs. Pour le confirmer, il serait nécessaire d'étudier les niveaux d'expression des facteurs de transcription Hes-1 et Math-1 régulant respectivement l'engagement des cellules progénitrices TA vers le lignage absorptif ou le lignage sécréteur. De plus, la réalisation d'immunomarquages spécifiques des différents types cellulaires constituant ces deux lignages pourraient permettre de quantifier ceux-ci et de conclure quant aux conséquences de la surexpression de Nétrine-1 sur le nombre de cellules sécrétrices et absorptives dans l'épithélium intestinal.

Au cours de nos expériences nous avons pu constater que la variabilité entre individus des niveaux d'expression génique était relativement importante. Ainsi, afin de déterminer si l'augmentation observée des niveaux d'expression génique des marqueurs *Muc2* et *ChgA* est significative, le nombre d'animaux intégrés à notre étude devra être augmenté.

Ex vivo, le traitement d'organoïdes par la Nétrine-1 recombinante ainsi que la sur-expression de celle-ci au sein de ces cultures primaires a révélé la capacité de cette molécule à promouvoir la croissance des organoïdes et à augmenter l'expression de marqueurs spécifiques des CSI. Dans ce contexte la Nétrine-1 semble donc participer à la régulation du compartiment souche de l'épithélium intestinal en favorisant l'auto-renouvellement des CSI. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus *in vivo*, mais peuvent être expliqués par plusieurs hypothèses. Une première explication pourrait résulter du faible niveau de surexpression induit par l'activité promotrice endogène du locus Rosa26. *In vivo* cette surexpression modérée ne serait peut être pas suffisante à perturber l'homéostasie intestinale finement maintenue par les cellules épithéliales et stromales. Il peut également être envisagé qu'*in vivo* la concentration de Nétrine observée dans la niche des CSI est saturante par rapport à la disponibilité de ses récepteurs exprimés à la surface des CSI et/ou des cellules de Paneth. La surexpression de Nétrine-1 *in vivo* n'aurait donc aucune conséquence sur le compartiment souche. *Ex vivo*, l'absence de source stromale de Nétrine, conduit à une concentration bien moindre de cette molécule dans l'environnement des CSI et les récepteurs exprimés à la surface des cellules épithéliales ne sont donc pas tous liés. Dans ce cas, les cellules répondraient à l'apport exogène ou à la surexpression de Nétrine-1.

Nos résultats *ex vivo* ont également montré que le niveau d'expression des marqueurs des CSI *Lgr5*, *Olfm4* et *Smoc2* est généralement plus fortement induit en présence de Nétrine-1 recombinante que lors de la surexpression de celle-ci. Il est envisageable que ceci résulte d'une différence de concentration finale de Nétrine-1 au sein des cultures. En effet la concentration de Nétrine-1 recombinante utilisée ici (900ng/ml) est relativement importante. Or, la surexpression de Nétrine-1 induite dans les organoïdes Villin :CreERT2 ;Rosa26-LSL-hNTN1 est pour sa part relativement modérée. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une surexpression de Nétrine-1 placée sous l'activité d'un promoteur fort potentialiserait d'autant plus l'augmentation d'expression des marqueurs souches observée. Cette hypothèse pourrait être testée *via* l'infection virale d'organoïdes sauvages permettant l'expression d'un plasmide codant pour une Nétrine-1 inductible par exemple.

Enfin l'analyse du niveau d'expression de gènes spécifiques des différents types du lignage sécréteur, tels que *Lys1*, *Muc2* et *ChgA* ainsi que du marqueur *Alpi*, spécifique du lignage absorptif devrait révéler si *ex vivo* la surexpression de Nétrine-1 pourrait également conduire à une augmentation des marqueurs des cellules appartenant au lignage sécréteur.

L'ensemble des résultats obtenus *in vivo* et *ex vivo* lors de la surexpression de Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal adulte montrent donc que la Nétrine-1 semble participer au maintien de l'homéostasie de cet épithélium ainsi qu'à la régulation du compartiment souche. Bien qu'extrêmement préliminaires ces résultats ouvrent la voie à diverses hypothèses concernant le(s) rôle(s) de la Nétrine-1 dans la régulation du compartiment souche intestinal. Celle-ci pourrait par exemple agir directement sur les CSI, ou au contraire agir indirectement sur celles-ci en modulant les fonctions des cellules actrices de la niche, ou encore faire partie intégrante de la lame basale sous-jacente au compartiment souche.

1. La Nétrine-1 : une molécule régulant les fonctions des CSI de façon directe?

La mise en culture de cryptes intestinales dans les conditions conventionnelles ENR, (en présence des facteurs de croissances EGF, Noggin et R-Spondin-1) conduit à la formation d'organoïdes au sein desquels les CSI se différencient spontanément en l'ensemble des types cellulaires de l'épithélium tout en maintenant leur propre existence par auto-renouvellement. En ajoutant à ces conditions de culture du CHIR99021, inhibiteur de la GSK3β, ainsi que de l'acide valproïque, activateur de la voie Notch, Yin et *al.* ont montré qu'il était possible d'obtenir une culture quasiment homogène de CSI Lgr5$^+$, dépourvue de cellules différenciées (Yin et al., 2014). Ces conditions de culture sont couramment nommées ENR-CV. Pour tester si la Nétrine-1 pourrait réguler le compartiment souche intestinal adulte *via* une action directe sur les CSI, de telles cultures devront être envisagées. En plaçant des CSI Lgr5$^+$, triées par cytométrie en flux, dans des conditions cultures ENR-CV supplémentées ou non par de la Nétrine-1 recombinante nous pourrions en effet déterminer si la Nétrine-1 (1) potentialise les capacités d'auto-renouvellement des CSI, (2) agit en synergie avec la R-Spondin-1 ou permet de la substituer, ou (3) module le processus de différenciation des CSI.
Dans le cas où le gain de Nétrine-1 s'avérerait moduler les fonctions des CSI par une action directe il sera alors nécessaire d'investiguer les mécanismes moléculaires régissant cette action. Après avoir identifié le ou les récepteurs à la Nétrine-1 exprimés à la surface des CSI Lgr5$^+$ des expériences de perte de fonction par infection virale de sh-ARN spécifiques du ou des récepteurs engagés seront donc envisagées.

Lors de l'ontogénèse intestinale nous avons constaté que la surexpression de Nétrine-1 conduisait à une diminution d'expression protéique du récepteur Néogénine sans affecter celle du récepteur Unc5-B. Un autre point important serait donc de vérifier si ce phénomène

est également observé dans nos cultures d'organoïdes adultes en conditions ENR et ENR-CV, ainsi que dans un contexte *in vivo*. Si tel est cas, il peut être proposé que le gain de Nétrine-1 favorise la signalisation induite par le récepteur Unc5-B, tout en inhibant celle induite par le récepteur Néogénine, perturbant ainsi l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation. Cette hypothèse est renforcée par les expériences de Ozmadenci et *al.* qui ont récemment montré que dans les cellules souches embryonnaires de souris la Nétrine-1 pouvait favoriser soit l'auto-renouvellement de celles-ci soit au contraire leur engagement dans un processus de différenciation, en fonction du récepteur engagé et du niveau d'expression protéique de celui-ci. De façon extrêmement intéressante ces auteurs ont également montré que le gain de Nétrine-1 au sein de cellules souches embryonnaires de souris permettait de sensibiliser celles-ci à la voie Wnt, les maintenant ainsi dans un état plus naïf de pluripotence. (Ozmadenci et al., 2017, en soumission, annexe2).

2. La Nétrine-1 : une molécule contrôlant les cellules de la niche des CSI ?

Les données déposées dans les bases de données indiquent que chez l'adulte les cellules de Paneth et les myofibroblastes sous-épithéliaux (ISEMFs) semblent exprimer certains récepteurs à la Nétrine-1. Bien qu'à confirmer et préciser, ces résultats laissent donc supposer que la Nétrine-1 pourrait réguler les fonctions des CSI indirectement, en modulant la production de certains facteurs clés par les cellules actrices de la niche. Plusieurs hypothèses peuvent ainsi être envisagées. Par exemple, la Nétrine-1 pourrait réguler (1) la localisation des cellules de Paneth et des ISEMFs à la base des cryptes, (2) leurs fonctions, ou encore (3) leur survie. La perte de Nétrine-1 dans l'intestin pourrait ainsi conduire à une dérégulation de la niche des CSI *via*:

- une mauvaise localisation des cellules de Paneth et/ou des ISEMFs, les éloignant ainsi de l'environnement des CSI.
- une modification du transcriptome et/ou du sécrétome des cellules de Paneth et des ISEMFs, conduisant à une altération d'expression des facteurs Wnt, des inhibiteurs des Bmp ou des ligands Notch delta like par exemple.
- la mort des cellules de Paneth et/ou des ISEMFs par activation des voies pro-apoptotiques des récepteurs à dépendance à la Nétrine-1.

Ces différentes hypothèses pourraient être abordées dans le modèle murin d'invalidation conditionnelle et ubiquitaire de la Nétrine-1 : Rosa26 :CreERT2 ; Nétrine-1lox, par des expériences d'immunomarquages des cellules de Paneth et des ISEMFs, des essais

TUNEL (analyse de l'apoptose), ainsi que par l'analyse des transcriptomes en RNA seq de ces deux populations cellulaires.

3. La Nétrine-1 : une molécule régulant les propriétés de la lame basale de l'épithélium intestinal ?

La lame basale est un élément essentiel de la niche des cellules souches intestinales. En effet, en plus de constituer un élément d'ancrage indispensable aux cellules épithéliales, elle régule activement les processus de prolifération, croissance, différenciation et survie de celles-ci. *In vivo*, la lame basale située à la base des cryptes de l'épithélium intestinal est principalement composée de laminine-111, collagène IV, fibronectine, acide hyaluronique, et perlecan (Simon-Assmann et al., 1990), (Simon-Assmann et al., 1995), (Gjorevski et al., 2016). *Ex vivo*, dans les cultures d'organoïdes intestinaux réalisées selon la méthode proposée par Sato et *al.* en 2009, la lame basale est artificiellement recréée par la présence d'une matrice 3D d'origine animale et de composition complexe et variable : le Matrigel. Afin d'identifier les paramètres et composants apportés par le Matrigel et de pouvoir éventuellement y substituer, Gjorevski et *al.* se sont attachés à recréer une matrice synthétique enrichie de différentes molécules autorisant l'expansion des CSI et la formation d'organoïdes. Ces travaux ont mis en exergue qu'outre la présence nécessaire de Laminine-111, Collagène IV, Fibronectine, acide hyaluronique et Perlécan, la rigidité de la matrice était un élément essentiel. Ainsi, une matrice hautement rigide favorise significativement la prolifération des CSI, selon des mécanismes dépendants de la protéine Yap-1 (yes-associated protein). A l'inverse, la différenciation des CSI et la formation d'organoïdes requiert une matrice plus souple (Gjorevski et al., 2016). Yap-1, un effecteur de la voie de signalisation Hippo, est connu pour son rôle essentiel dans la prolifération des CSI lors des processus de régénération tissulaire, mais également pour son rôle crucial dans le contrôle de la taille des organes ainsi que dans la tumorigénèse (Gjorevski et al., 2016), (Qi et al., 2015). De façon intéressante, deux études ont récemment révélé la capacité de la Nétrine-1 à augmenter la stabilité de Yap-1 et à promouvoir la translocation nucléaire de ce facteur de transcription (Qi et al., 2015), (Chen et al., 2016). Il apparaît donc probable que l'ajout de Nétrine-1 ou que sa surexpression *ex vivo* dans les cultures d'organoïdes puisse promouvoir l'activation de la voie de signalisation dépendante de Yap-1 et conduire à une augmentation de la rigidité de la matrice 3D utilisée. Ceci favoriserait alors la prolifération des CSI. La localisation cellulaire de Yap-1, et par conséquent sa fonction, étant régulée par son statut de phosphorylation, des Western blots anti-Yap et anti-phospho-Yap seraient donc à envisager sur nos cultures d'organoïdes.

Hormis son action potentielle sur la protéine Yap-1, la Nétrine-1 pourrait également réguler l'intégrité de la lame basale en interagissant directement avec certains de ces composants tels que les Perlécans, le Collagène, ou les Laminines. A titre d'exemple Reuten et *al.* montrèrent dans une étude récente que de part son interaction avec la Laminine-111, la Nétrine-4 perturbe l'intégrité et l'organisation des lames basales (Reuten et al., 2016). Bien qu'il semble que la Nétrine-1 ne soit pas capable de lier la Laminine-111, *in vivo* dans l'oreille interne en développement celle-ci apparait néanmoins nécessaire à la rupture de la lame basale ayant lieu lors de l'organogénèse des différents canaux (Salminen et al., 2000), (Abraira et al., 2008). Les malformations du canal semi-circulaire de l'oreille interne observées chez les mutants invalidés pour la Nétrine-1 résulterait ainsi de l'incapacité à rompre cette lame basale.

L'absence de Nétrine-1 dans l'intestin pourrait donc perturber l'intégrité de la lame basale sous jacente à l'épithélium et de ce fait altérer l'homéostasie de celui-ci. Cependant, chez l'embryon aucune perturbation de la lame basale, visualisée par un immunomarquage anti-Laminines, n'a été observée. Ces résultats nécessiteraient toutefois d'être corroborés par des immunomarquages complémentaires tels que des immunomarquages anti-Collagène ou anti-Intégrines. Ces expériences seraient également à réaliser chez l'adulte.

4. La Nétrine-1 : une molécule impliquée dans la tumorigénèse intestinale.

Chez l'adulte, l'expression anormalement élevée de Nétrine-1 a été observée dans divers types de cancers, tels que dans certains cancers du sein (Fitamant et al., 2008), de la prostate , du pancréas (Dumartin et al., 2010) ou du poumon (Delloye-Bourgeois et al., 2009) par exemple. De façon intéressante bien que le niveau d'expression de cette molécule soit relativement bas dans les cancers colorectaux sporadiques, la surexpression ectopique de celles-ci dans l'épithélium intestinal murin a montré la capacité de cette protéine à promouvoir l'initiation tumorale et plus particulièrement la progression tumorale (Mazelin et al., 2004). Afin d'approfondir ces résultats, il serait intéressant d'investiguer les conséquences de la perte d'expression endogène de Nétrine-1 dans la tumorigénèse intestinale. Par exemple le rôle de la Nétrine-1 dans la progression de la tumorigénèse intestinale pourrait être approché *via* un modèle murin APC1638N ; Rosa26 :CreERT2 ; Netrine-1lox. Le rôle de cette protéine dans l'initiation tumorale pourrait par ailleurs être étudié grâce à la génération d'un modèle murin permettant de sur-activer la voie Wnt dans

les CSI Lgr5^{+} tout en délétant la Nétrine-1 dans l'ensemble des types cellulaires de l'intestin. Un modèle Lgr5 : CreERT2 ; APClox ; Rosa26-FlippaseERT2 ; Nétrine-1Frt pourrait ainsi être proposé.

Pour conclure, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'implication de la Nétrine-1 dans l'ontogénèse de l'épithélium intestinal ainsi que dans la régulation des cellules souches intestinales adultes *ex vivo*. Ces résultats préliminaires soulèvent de nombreuses questions quant au(x) rôle(s) précis de la Nétrine-1 dans ce tissu. De nombreuses expériences restent donc à réaliser afin de déterminer, notamment, le(s) type(s) cellulaire(s) sur le(s)quel(s) cette protéine agit, ainsi que les récepteurs impliqués et les signalisations sous-jacentes. Les nouveaux modèles murins conditionnels présentés et validés au cours de cette thèse, constituent des outils puissants pour les études à venir, tant dans l'intestin que dans d'autres tissus. Cette étude ouvre également la question du rôle de la Nétrine-1 dans la régulation d'autres cellules souches adultes telles que les cellules souches neurales par exemple.

BIBLIOGRAPHIE

Abraira, V.E., del Rio, T., Tucker, A.F., Slonimsky, J., Keirnes, H.L., and Goodrich, L. V (2008). Cross-repressive interactions between Lrig3 and netrin 1 shape the architecture of the inner ear. Development *135*, 4091–4099.

Alcántara, S., Ruiz, M., De Castro, F., Soriano, E., and Sotelo, C. (2000). Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. Development *127*, 1359–1372.

Amano, K., Fujii, M., Arata, S., Tojima, T., Ogawa, M., Morita, N., Shimohata, A., Furuichi, T., Itohara, S., Kamiguchi, H., et al. (2009). DSCAM Deficiency Causes Loss of Pre-Inspiratory Neuron Synchroneity and Perinatal Death. J. Neurosci. *29*, 2984–2996.

Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., et al. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. Development *132*, 1443–1451.

Andreu, P., Peignon, G., Slomianny, C., Taketo, M.M., Colnot, S., Robine, S., Lamarque, D., Laurent-Puig, P., Perret, C., and Romagnolo, B. (2008). A genetic study of the role of the Wnt/β-catenin signalling in Paneth cell differentiation. Dev. Biol. *324*, 288–296.

Andrews, G.L., Tanglao, S., Farmer, W.T., Morin, S., Brotman, S., Berberoglu, M.A., Price, H., Fernandez, G.C., Mastick, G.S., Charron, F., et al. (2008). Dscam guides embryonic axons by Netrin-dependent and -independent functions. Development *135*, 3839–3848.

Avetisyan, M., Schill, E.M., and Heuckeroth, R.O. (2015). Building a second brain in the bowel. J. Clin. Invest. *125*, 899–907.

Bae, G.-U., Yang, Y.-J., Jiang, G., Hong, M., Lee, H.-J., Tessier-Lavigne, M., Kang, J.-S., and Krauss, R.S. (2009). Neogenin Regulates Skeletal Myofiber Size and Focal Adhesion Kinase and Extracellular Signal-regulated Kinase Activities In Vivo and In Vitro. Mol. Biol. Cell *20*, 4920–4931.

Barallobre, M.J., Pascual, M., Del Río, J.A., and Soriano, E. (2005). The Netrin family of guidance factors: Emphasis on Netrin-1 signalling. Brain Res. Rev. *49*, 22–47.

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.

Barrett, C., and Guthrie, S. (2001). Expression patterns of the netrin receptor UNC5H1 among developing motor neurons in the embryonic rat hindbrain. Mech. Dev. *106*, 163–166.

Batlle, 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). β-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. Cell *111*, 251–263.

Beck, F., Chawengsaksophak, K., Waring, P., Playford, R.J., and Furness, J.B. (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 7318–7323.

Bell, S.M., Zhang, L., Xu, Y., Besnard, V., Wert, S.E., Shroyer, N., and Whitsett, J.A. (2013). Kruppel-like factor 5 controls villus formation and initiation of cytodifferentiation in the embryonic intestinal epithelium. Dev. Biol. *375*, 128–139.

Bennett, K.L., Bradshaw, J., Youngman, T., Rodgers, J., Greenfield, B., Aruffo, A., and Linsley, P.S. (1997). Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. J. Biol. Chem. *272*, 26940–26946.

Bernet, A., and Fitamant, J. (2008). Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion. Expert Opin. Ther. Targets *12*, 995–1007.

Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M.M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2007). Inactivation of the UNC5C Netrin-1 Receptor Is Associated With Tumor Progression in Colorectal Malignancies. Gastroenterology *133*, 1840–1848.

Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 356–368.

Bin, J.M., Han, D., Lai Wing Sun, K., Croteau, L.P., Dumontier, E., Cloutier, J.F., Kania, A., and Kennedy, T.E. (2015). Complete Loss of Netrin-1 Results in Embryonic Lethality and Severe Axon Guidance Defects without Increased Neural Cell Death. Cell Rep. *12*, 1099–1106.

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

Bjerknes, M., and Cheng, H. (1981b). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from paneth cells in the newborn mouse. Am. J. Anat. *160*, 65–75.

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

Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M., and Sotelo, C. (1999). Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. J. Neurosci. *19*, 4407–4420.

Bouvrée, K., Larrivée, B., Lv, X., Yuan, L., DeLafarge, B., Freitas, C., Mathivet, T., Bréant, C., Tessier-Lavigne, M., Bikfalvi, A., et al. (2008). Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis in developing avian embryos. Dev. Biol. *318*, 172–183.

Bry, L., Falk, P., Huttner, K., Ouellette, A., Midtvedt, T., and Gordon, J.I. (1994). Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 10335–10339.

Burgess, R.W., Jucius, T.J., and Ackerman, S.L. (2006). Motor Axon Guidance of the Mammalian Trochlear and Phrenic Nerves: Dependence on the Netrin Receptor Unc5c and Modifier Loci. J. Neurosci. *26*, 5756–5766.

Calvert, R., and Pothier, P. (1990). Migration of fetal intestinal intervillous cells in neonatal mice. Anat. Rec. *227*, 199–206.

Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 11452–11457.

Carmon, K.S., Lin, Q., Gong, X., Thomas, A., and Liu, Q. (2012). LGR5 interacts and cointernalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/beta-catenin signaling. Mol. Cell. Biol. *32*, 2054–2064.

Castets, M., Coissieux, M.M., Delloye-Bourgeois, C., Bernard, L., Delcros, J.G., Bernet, A., Laudet, V., and Mehlen, P. (2009). Inhibition of Endothelial Cell Apoptosis by Netrin-1 during Angiogenesis. Dev. Cell *16*, 614–620.

Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Scoazec, J.-Y., et al. (2012). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. Nature *482*, 534–537.

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

Chan, S.S.Y., Zheng, H., Su, M.W., Wilk, R., Killeen, M.T., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1996). UNC-40, a C. elegans homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. Cell *87*, 187–195.

Chen, H., Chen, Q., and Luo, Q. (2016). Expression of netrin-1 by hypoxia contributes to the invasion and migration of prostate carcinoma cells by regulating YAP activity. Exp. Cell Res. *349*, 302–309.

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

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

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

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

Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 296–306.

St. Clair, W.H., and Osborne, J.W. (1985). Crypt fission and crypt number in the small and large bowel of postnatal rats. Cell Prolif. *18*, 255–262.

Clarke, R.M. (1972). The effect of growth and of fasting on the number of villi and crypts in the small intestine of the albino rat. J. Anat. *112*, 27–33.

Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. Cell *154*, 274–284.

Colamarino, S.A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. Cell *81*, 621–629.

Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Forcet, C., Moyse, E., Chédotal, A., and Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. Nature *407*, 747–750.

Dakouane-Giudicelli, M., Duboucher, C., Fortemps, J., Missey-Kolb, H., Brulé, D., Giudicelli, Y., and de Mazancourt, P. (2010). Characterization and expression of netrin-1 and its receptors UNC5B and DCC in human placenta. J. Histochem. Cytochem. *58*, 73–82.

Dakouane-Giudicelli, M., Alfaidy, N., and De Mazancourt, P. (2014). Netrins and Their Roles in Placental Angiogenesis. Biomed Res. Int. *2014*, 901941.

Date, S., and Sato, T. (2015). Mini-Gut Organoids: Reconstitution of the Stem Cell Niche. Annu. Rev. Cell Dev. Biol *313221*, 1–32.

Dehmer, J.J., Garrison, A.P., Speck, K.E., Dekaney, C.M., van Landeghem, L., Sun, X., Henning, S.J., and Helmrath, M.A. (2011). Expansion of intestinal epithelial stem cells during murine development. PLoS One *6*, e27070.

Delcros, J.G., and Mehlen, P. (2013). Les recepteurs à dépendance : Carrefours entre vie et mort. Bull. Cancer *100*, 1261–1274.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.-M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. J. Natl. Cancer Inst. *101*, 237–247.

Dominici, C., Moreno-Bravo, J.A., Puiggros, S.R., Rappeneau, Q., Rama, N., Vieugue, P., Bernet, A., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2017). Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. Nature *545*, 350–354.

Dumartin, L., Quemener, C., Laklai, H., Herbert, J., Bicknell, R., Bousquet, C., Pyronnet, S., Castronovo, V., Schilling, M.K., Bikfalvi, A., et al. (2010). Netrin-1 Mediates Early Events in Pancreatic Adenocarcinoma Progression, Acting on Tumor and Endothelial Cells. Gastroenterology *138*, 1595–1606.e8.

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.

Engelkamp, D. (2002). Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. Mech. Dev. *118*, 191–197.

Fafilek, B., Krausova, M., Vojtechova, M., Pospichalova, V., Tumova, L., Sloncova, E., Huranova, M., Stancikova, J., Hlavata, A., Svec, J., et al. (2013). Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts With Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells. Gastroenterology *144*, 381–391.

Farin, H.F., Van Es, J.H., and Clevers, H. (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of paneth cells. Gastroenterology *143*, 1518–1529.e7.

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

Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R. V, Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature *386*, 796–804.

Fearon, E., Cho, K., Nigro, J., Kern, S., Simons, J., Ruppert, J., Preisinger, A., Thomas, G., Kinzler, K., and Et, A. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science (80-.). *247*, 49–56.

Feoktistov, I., and Biaggioni, I. (1997). Adenosine A 2B Receptors. Pharmacol. Rev. *49*, 381–402.

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.

Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.-M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.-Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 4850–4855.

Fitzgerald, D.P., Cole, S.J., Hammond, A., Seaman, C., and Cooper, H.M. (2006). Characterization of neogenin-expressing neural progenitor populations and migrating neuroblasts in the embryonic mouse forebrain. Neuroscience *142*, 703–716.

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.

Fre, S., Hannezo, E., Sale, S., Huyghe, M., Lafkas, D., Kissel, H., Louvi, A., Greve, J., Louvard, D., and Artavanis-Tsakonas, S. (2011). Notch lineages and activity in intestinal stem cells determined by a new set of knock-in mice. PLoS One *6*, e25785.

Gad, J.M., Keeling, S.L., Wilks, A.F., Tan, S.S., and Cooper, H.M. (1997). The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. Dev. Biol. *192*, 258–273.

Gan, W.B., Wong, V.Y., Phillips, A., Ma, C., Gershon, T.R., and Macagno, E.R. (1999). Cellular expression of a leech netrin suggests roles in the formation of longitudinal nerve tracts and in regional innervation of peripheral targets. J. Neurobiol. *40*, 103–115.

Garabedian, E.M., Roberts, L.J.J., McNevin, M.S., and Gordon, J.I. (1997). Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. J. Biol. Chem. *272*, 23729–23740.

Geisbrecht, B. V, Dowd, K.A., Barfield, R.W., Longo, P.A., and Leahy, D.J. (2003a). Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. J. Biol. Chem. *278*, 32561–32568.

Geisbrecht, B. V., Dowd, K.A., Barfield, R.W., Longo, P.A., and Leahy, D.J. (2003b). Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. J. Biol. Chem. *278*, 32561–32568.

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., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. Nature *529*, 226–230.

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

Gordon, J.I., and Hermiston, M.L. (1994). Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. Curr. Opin. Cell Biol. *6*, 795–803.

Grandin, M., Meier, M., Delcros, J.G., Nikodemus, D., Reuten, R., Patel, T.R., Goldschneider, D., Orriss, G., Krahn, N., Boussouar, A., et al. (2016). Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. Cancer Cell *29*, 173–185.

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

Guijarro, P., Simó, S., Pascual, M., Abasolo, I., Del Río, J.A., and Soriano, E. (2006). Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way. Mol. Cell. Neurosci. *33*, 389–400.

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. (2004). De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine. Science *303*, 1684–1686.

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 (80-.). *303*, 1684–1686.

Harris, R., Sabatelli, L.M., and Seeger, M.A. (1996). Guidance cues at the Drosophila CNS midline: Identification and characterization of two Drosophila Netrin/UNC-6 homologs. Neuron *17*, 217–228.

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

Heath, J.P. (1996). Epithelial cell migration in the intestine. Cell Biol. Int. *20*, 139–146.

Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans. Neuron *4*, 61–85.

Hedrick, L., Cho, K.R., Fearon, E.R., Wu, T.C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1994). The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. Genes Dev. *8*, 1174–1183.

Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. Cell *97*, 927–941.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell *69*, 11–25.

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

Jiang, Y., Liu, M. tsai, and Gershon, M.D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. Dev. Biol. *258*, 364–384.

Jung, P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M.A., Sancho, E., et al. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. Nat. Med. *17*, 1225–1227.

Junge, H.J., Yung, A.R., Goodrich, L. V, and Chen, Z. (2016). Netrin1/DCC signaling promotes neuronal migration in the dorsal spinal cord. Neural Dev. *11*, 19.

Kappler, J., Franken, S., Junghans, U., Hoffmann, R., Linke, T., Müller, H.W., and Koch, K.W. (2000). Glycosaminoglycan-binding properties and secondary structure of the C-terminus of netrin-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *271*, 287–291.

Karen Lai Wing Sun, James P. Correia, and Timothy E. Kennedy (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. Development 2153–2169.

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

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

Keeling, S.L., Gad, J.M., and Cooper, H.M. (1997). Mouse Neogenin, a DCC-like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis. Oncogene *15*, 691–700.

Kefeli, U., Ucuncu Kefeli, A., Cabuk, D., Isik, U., Sonkaya, A., Acikgoz, O., Ozden, E., and Uygun, K. (2017). Netrin-1 in cancer: Potential biomarker and therapeutic target?. Tumour Biol. *39*, 1010428317698388.

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S.Y., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. Cell *87*, 175–185.

Kim, K.-A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., et al. (2005). Mitogenic influence of human R-Spondin1 on the intestinal epithelium. Science (80-.). *309*, 1256–1259.

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

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

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

Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., and Martin, G.R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry *25*, 312–318.

Koch, S. (2017). Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine. Differentiation *97*, 1–8.

Koch, A.W., Mathivet, T., Larrivée, B., Tong, R.K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvrée, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., et al. (2011). Robo4 Maintains Vessel Integrity and Inhibits Angiogenesis by Interacting with UNC5B. Dev. Cell *20*, 33–46.

König, K., Gatidou, D., Granja, T., Meier, J., Rosenberger, P., and Mirakaj, V. (2012). The axonal guidance receptor neogenin promotes acute inflammation. PLoS One *7*, e32145.

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

Kosinski, C., Li, V.S.W., Chan, A.S.Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T., et al. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 15418–15423.
Kosinski, C., Stange, D.E., Xu, C., Chan, A.S., Ho, C., Yuen, S.T., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Clevers, H., Leung, S.Y., et al. (2010). Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. Gastroenterology *139*, 893–903.

Kruger, R.P., Lee, J., Li, W., and Guan, K.-L. (2004). Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation. J. Neurosci. *24*, 10826–10834.

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.

Lacroix, B., Kedinger, M., Simon-Assmann, P., and Haffen, K. (1984). Early organogenesis of human small intestine: scanning electron microscopy and brush border enzymology. Gut *25*, 925–930.

Lahar, N., Lei, N.Y., Wang, J., Jabaji, Z., Tung, S.C., Joshi, V., Lewis, M., Stelzner, M., Martín, M.G., and Dunn, J.C.Y. (2011). Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. PLoS One *6*, e26898.

Lander, A.D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A.L., Trumpp, A., and Oskarsson, T. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? BMC Biol. *10*, 19.

Larrivée, B., Freitas, C., Trombe, M., Lv, X., DeLafarge, B., Yuan, L., Bouvrée, K., Bréant, C., Del Toro, R., Bréchot, N., et al. (2007). Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. Genes Dev. *21*, 2433–2447.

Latil, A., Chêne, L., Cochant-Priollet, B., Mangin, P., Fournier, G., Berthon, P., and Cussenot, O. (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. Int. J. Cancer *103*, 306–315.

de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. Nature *476*, 293–297.

Leblond, C.P., and Stevens, C.E. (1948). The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. Anat. Rec. *100*, 357–377.

Lei, N.Y., Jabaji, Z., Wang, J., Joshi, V.S., Brinkley, G.J., Khalil, H., Wang, F., Jaroszewicz, A., Pellegrini, M., Li, L., et al. (2014). Intestinal subepithelial myofibroblasts support the growth of intestinal epithelial stem cells. PLoS One *9*, e84651.

Leonardo, E.D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S.L., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors. Nature *386*, 833–838.

Leushacke, M., and Barker, N. (2014). Ex vivo culture of the intestinal epithelium: strategies and applications. Gut *63*, 1345–1354.

Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science *327*, 542–545.

Li, X., Madison, B.B., Zacharias, W., Kolterud, A., States, D., and Gumucio, D.L. (2007). Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. Physiol. Genomics *29*, 290–301.

Liu, G., Li, W., Wang, L., Kar, A., Guan, K.-L., Rao, Y., and Wu, J.Y. (2009). DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 2951–2956.

Liu, Y., Stein, E., Oliver, T., Li, Y., Brunken, W.J., Koch, M., Tessier-Lavigne, M., and Hogan, B.L.M. (2004). Novel role for netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. Curr. Biol. *14*, 897–905.

Livesey, F.J., and Hunt, S.P. (1997). Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. Mol. Cell. Neurosci. *8*, 417–429.

Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. EMBO J. *20*, 2715–2722.

Lourenço, F.C., Galvan, V., Fombonne, J., Corset, V., Llambi, F., Müller, U., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2009). Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. Cell Death Differ. *16*, 655–663.

Lu, X., le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., de Lafarge, B., Sugiyama, D., Bréant, C., Claes, F., De Smet, F., Thomas, J.-L., et al. (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. Nature *432*, 179–186.

Ly, A., Nikolaev, A., Suresh, G., Zheng, Y., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (2008). DSCAM Is a Netrin Receptor that Collaborates with DCC in Mediating Turning Responses to Netrin-1. Cell *133*, 1241–1254.

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. Development *132*, 279–289.

Manitt, C., Thompson, K.M., and Kennedy, T.E. (2004). Developmental shift in expression of netrin receptors in the rat spinal cord: Predominance of UNC-5 homologues in adulthood. J. Neurosci. Res. *77*, 690–700.

El Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H.J., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. Genesis *39*, 186–193.

Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. BioEssays *24*, 91–98.

Matilainen, T., Haugas, M., Kreidberg, J.A., and Salminen, M. (2007). Analysis of Netrin 1 receptors during inner ear development. Int. J. Dev. Biol. *51*, 409–413.

Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P.P., Mueller, B.K., Strittmatter, S.M., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. Nat. Cell Biol. *6*, 749–755.

Matus, D.Q., Pang, K., Marlow, H., Dunn, C.W., Thomsen, G.H., and Martindale, M.Q. (2006). Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 11195–11200.

Mazelin, L., Bernet, A., and Bonod-Bidaud, C. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature *431*.

McKenna, W.L., Wong-Staal, C., Kim, G.C., Macias, H., Hinck, L., and Bartoe, J.L. (2008). Netrin-1-independent adenosine A2b receptor activation regulates the response of axons to netrin-1 by controlling cell surface levels of UNC5A receptors. J. Neurochem. *104*, 1081–1090.

McLin, V.A., Henning, S.J., and Jamrich, M. (2009). The Role of the Visceral Mesoderm in the Development of the Gastrointestinal Tract. Gastroenterology *136*, 2074–2091.

Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature *395*, 801–804.

Mifflin, R.C., Pinchuk, I. V., Saada, J.I., and Powell, D.W. (2011). Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *300*, G684–G696.

Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadient, 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. *82*, 341–358.

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.

Morita, H., Mazerbourg, S., Bouley, D.M., Luo, C.-W.W., Kawamura, K., Kuwabara, Y., Baribault, H., Tian, H., and Hsueh, A.J.W. (2004). Neonatal lethality of {LGR5} null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. Mol. Cell. Biol. *24*, 9736–9743.

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.

Mustata, R.C., Vasile, G., Fernandez-Vallone, V., Strollo, S., Lefort, A., Libert, F., Monteyne, D., Pérez-Morga, D., Vassart, G., and Garcia, M.-I. (2013). Identification of Lgr5-Independent Spheroid-Generating Progenitors of the Mouse Fetal Intestinal Epithelium. Cell Rep. *5*, 421–432.

Nakashiba, T., Nishimura, S., Ikeda, T., and Itohara, S. (2002). Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. Mech. Dev. *111*, 47–60.
Nigmatullina, L., Norkin, M., Dzama, M.M., Messner, B., Sayols, S., and Soshnikova, N. (2017). Id2 controls specification of Lgr5 + intestinal stem cell progenitors during gut development. EMBO J. *36*, 869–885.

Noah, T.K., Donahue, B., and Shroyer, N.F. (2011). Intestinal development and differentiation. Exp. Cell Res. *317*, 2702–2710.

Noren, N.K., and Pasquale, E.B. (2004). Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. Cell. Signal. *16*, 655–666.

Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., Ho, Q.T., Ueno, H., Toda, S., Sugihara, H., Fujimoto, K., Weissman, I.L., Capecchi, M.R., et al. (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. Nat. Med. *15*, 701–706.

Osborne, P.B., Halliday, G.M., Cooper, H.M., and Keast, J.R. (2005). Localization of immunoreactivity for deleted in colorectal cancer (DCC), the receptor for the guidance factor netrin-1, in ventral tier dopamine projection pathways in adult rodents. Neuroscience *131*, 671–681.

Palmesino, E., Haddick, P.C.G., Tessier-Lavigne, M., and Kania, A. (2012). Genetic analysis of DSCAM's role as a Netrin-1 receptor in vertebrates. J. Neurosci. *32*, 411–416.

Park, K.W., Crouse, D., Lee, M., Karnik, S.K., Sorensen, L.K., Murphy, K.J., Kuo, C.J., and Li, D.Y. (2004). The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 16210–16215.

Park, K.W., Urness, L.D., Senchuk, M.M., Colvin, C.J., Wythe, J.D., Chien, C. Bin, and Li, D.Y. (2005). Identification of new netrin family members in zebrafish: Developmental expression of netrin2 and netrin4. Dev. Dyn. *234*, 726–731.

Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., Kaestner, K.H., Kopan, R., Lewis, J., and Radtke, F. (2011). Dll1- and Dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. Gastroenterology *140*, 1230–1240.

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.

Potten, C.S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. Nature *269*, 518–521.

Potten, C.S. (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *353*, 821–830.

Potten, C.S., Kovacs, L., and Hamilton, E. (1974). CONTINUOUS LABELLING STUDIES ON MOUSE SKIN AND INTESTINE. Cell Prolif. *7*, 271–283.

Potten, C.S., Al-Barwari, S.E., and Searle, J. (1978). Differential radiation response amongst proliferating epithelial cells. Cell Tissue Kinet. *11*, 149–160.

Potten, C.S., Booth, C., Tudor, G.L., Booth, D., Brady, G., Hurley, P., Ashton, G., Clarke, R., Sakakibara, S.I., and Okano, H. (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. Differentiation *71*, 28–41.

Powell, A.E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E.J., Means, A.L., Washington, M.K., Higginbotham, J.N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S.E., et al. (2012). The pan-ErbB negative regulator lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. Cell *149*, 146–158.

Powell, D.W., Pinchuk, I. V, Saada, J.I., Chen, X., and Mifflin, R.C. (2011). Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. Annu. Rev. Physiol. *73*, 213–237.

Qi, Q., Li, D.Y., Luo, H.R., Guan, K.-L., and Ye, K. (2015). Netrin-1 exerts oncogenic activities through enhancing Yes-associated protein stability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 7255–7260.

Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., et al. (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. Nat. Commun. *8*, 13824.

Rajagopalan, S., Deitinghoff, L., Davis, D., Conrad, S., Skutella, T., Chedotal, A., Mueller, B.K., and Strittmatter, S.M. (2004). Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. Nat. Cell Biol. *6*, 756–762.

Rama, N., Goldschneider, D., Corset, V., Lambert, J., Pays, L., and Mehlen, P. (2012). Amyloid precursor protein regulates netrin-1-mediated commissural axon outgrowth. J. Biol. Chem. *287*, 30014–30023.

Ratcliffe, E.M., Fan, L., Mohammed, T.J., Anderson, M., Chalazonitis, A., and Gershon, M.D. (2011). Enteric neurons synthesize netrins and are essential for the development of the vagal sensory innervation of the fetal gut. Dev. Neurobiol. *71*, 362–373.

Reale, M.A., Hu, G., Zafar, A.I., Getzenberg, R.H., Levine, S.M., and Fearon, E.R. (1994). Expression and Alternative Splicing of the Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Gene in Normal and Malignant Tissues. Cancer Res. *54*, 4493–4501.

Reuten, R., Patel, T.R., McDougall, M., Rama, N., Nikodemus, D., Gibert, B., Delcros, J.-G., Prein, C., Meier, M., Metzger, S., et al. (2016). Structural decoding of netrin-4 reveals a regulatory function towards mature basement membranes. Nat. Commun. *7*, 13515.

Riccio, O., van Gijn, M.E., Bezdek, A.C., Pellegrinet, L., van Es, J.H., Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., Honjo, T., Clevers, H., and Radtke, F. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. EMBO Rep. *9*, 377–383.

Salminen, M., Meyer, B.I., Bober, E., and Gruss, P. (2000). Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. Development *127*, 13–22.

Sander, G.R., and Powell, B.C. (2004). Expression of notch receptors and ligands in the adult gut. J. Histochem. Cytochem. *52*, 509–516.

Sang Lee, S., Lee, S.-J., Hun Lee, S., Min Ryu, J., Su Lim, H., Sung Kim, J., Ju Song, E., Hyun Jung, Y., Jik Lee, H., Hun Kim, C., et al. (2016). Netrin-1-Induced Stem Cell Bioactivity Contributes to the Regeneration of Injured Tissues via the Lipid Raft-Dependent Integrin α6β4 Signaling Pathway. Nat. Publ. Gr. *6*, 1–15.

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

Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., et al. (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. Genes Dev. *18*, 1385–1390.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature *459*, 262–265.

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

Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., Van Es, J.H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D., et al. (2011b). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. Gastroenterology *141*, 1762–1772.

Sbarbati, R. (1982). Morphogenesis of the intestinal villi of the mouse embryo: chance and spatial necessity. J. Anat. *135*, 477–499.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells *4*, 7–25.

Schroder, N., and Gossler, A. (2002). Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. Gene Expr Patterns *2*, 247–250.

Schuijers, J., Van Der Flier, L.G., Van Es, J., and Clevers, H. (2014). Robust cre-mediated recombination in small intestinal stem cells utilizing the Olfm4 locus. Stem Cell Reports *3*, 234–241.

Seaman, C., Anderson, R., Emery, B., and Cooper, H.M. (2001). Localization of the netrin guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous systems. Mech. Dev. *103*, 173–175.

Serafini, T., Kennedy, T.E., Gaiko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. Cell *78*, 409–424.

Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell *87*, 1001–1014.

Shyer, A.E., Huycke, T.R., Lee, C., Mahadevan, L., and Tabin, C.J. (2015). Bending Gradients: How the intestinal stem cell gets its home. Cell *161*, 569–580.

Simon-Assmann, P., Simo, P., Bouziges, F., Haffen, K., and Kedinger, M. (1990). Synthesis of basement membrane proteins in the small intestine. Digestion *46 Suppl 2*, 12–21.

Simon-Assmann, P., Kedinger, M., De Arcangelis, A., Rousseau, V., and Simo, P. (1995). Extracellular matrix components in intestinal development. Experientia *51*, 883–900.

Skarnes, W.C., Moss, J.E., Hurtley, S.M., and Beddington, R.S. (1995). Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 6592–6596.

Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es, J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., et al. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. Cell *143*, 134–144.

Spence, J.R., Lauf, R., and Shroyer, N.F. (2011). Vertebrate intestinal endoderm development. Dev. Dyn. *240*, 501–520.

Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G.C., and Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. Dev. Cell *4*, 371–382.

Stanco, A., Szekeres, C., Patel, N., Rao, S., Campbell, K., Kreidberg, J.A., Polleux, F., and Anton, E.S. (2009). Netrin-1- 3 1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 7595–7600.

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

Stein, E., Zou, Y., Poo, M., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. Science *291*, 1976–1982.

Suzuki, A., Sekiya, S., Gunshima, E., Fujii, S., and Taniguchi, H. (2010). EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. Lab. Invest. *90*, 1425–1436.

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.

Tetteh, P.W., Basak, O., Farin, H.F., Wiebrands, K., Kretzschmar, K., Begthel, H., Van Den Born, M., Korving, J., De Sauvage, F., Van Es, J.H., et al. (2016). Replacement of Lost Lgr5-Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. Cell Stem Cell *18*, 203–213.

Thiebault, K., Mazelin, L., Pays, L., Llambi, F., Joly, M.-O., Scoazec, J.-Y., Saurin, J.-C., Romeo, G., and Mehlen, P. (2003). The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 4173–4178.

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.

Tong, J., Killeen, M., Steven, R., Binns, K.L., Culotti, J., and Pawson, T. (2001). Netrin Stimulates Tyrosine Phosphorylation of the UNC-5 Family of Netrin Receptors and Induces Shp2 Binding to the RCM Cytodomain. J. Biol. Chem. *276*, 40917–40925.

Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A.E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M.B., Hausmann, G., Cant, C., Aguet, M., and Basler, K. (2016). Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. Cell Rep. *15*, 911–918.

VanDussen, K.L., Carulli, A.J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, A., et al. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. Development *139*, 488–497.

Van der Flier, L.G., and Clevers, H. (2009b). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. Annu. Rev. Physiol. *71*, 241–260.

Van der Flier, L.G., van Gijn, M.E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., et al. (2009a). Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. Cell *136*, 903–912.

Van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature *435*, 959–963.

Van Es, J.H., Sato, T., van de Wetering, M., Lyubimova, A., Yee Nee, A.N., Gregorieff, A., Sasaki, N., Zeinstra, L., van den Born, M., Korving, J., et al. (2012a). Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. Nat. Cell Biol. *14*, 1099–1104.

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. (2012b). A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. Mol. Cell. Biol. *32*, 1918–1927.

Varadarajan, S.G., Kong, J.H., Phan, K.D., Kao, T.J., Panaitof, S.C., Cardin, J., Eltzschig, H., Kania, A., Novitch, B.G., and Butler, S.J. (2017). Netrin1 Produced by Neural Progenitors, Not Floor Plate Cells, Is Required for Axon Guidance in the Spinal Cord. Neuron *94*, 790–799.e3.

Varela-Echavarría, A., Tucker, A., Püschel, A.W., and Guthrie, S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. Neuron *18*, 193–207.

Vooijs, M., Ong, C.-T., Hadland, B., Huppert, S., Liu, Z., Korving, J., van den Born, M., Stappenbeck, T., Wu, Y., Clevers, H., et al. (2007). Mapping the consequence of Notch1 proteolysis in vivo with NIP-CRE. Development *134*, 535–544.

Walker, E.M., Thompson, C.A., and Battle, M.A. (2014). GATA4 and GATA6 regulate intestinal epithelial cytodifferentiation during development. Dev. Biol. *392*, 283–294.

Walton, K.D., Kolterud, A., Czerwinski, M.J., Bell, M.J., Prakash, A., Kushwaha, J., Grosse, A.S., Schnell, S., and Gumucio, D.L. (2012). Hedgehog-responsive mesenchymal clusters direct patterning and emergence of intestinal villi. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 15817–15822.

Walton, K.D., Whidden, M., Kolterud, A., Shoffner, S., Czerwinski, M.J., Kushwaha, J., Parmar, N., Chandhrasekhar, D., Freddo, A.M., Schnell, S., et al. (2015). Villification in the mouse: Bmp signals control intestinal villus patterning. Development *143*, 734–764.

Wang, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. J. Neurosci. *19*, 4938–4947.

Wang, W., Reeves, W.B., and Ramesh, G. (2009). Netrin-1 increases proliferation and migration of renal proximal tubular epithelial cells via the UNC5B receptor. Am. J. Physiol. Renal Physiol. *296*, F723-9.

Wentworth, L.E. (1984). The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. I. A Golgi analysis of ventral root neuron differentiation. J. Comp. Neurol. *222*, 81–95.

Williams, M.E., Lu, X., McKenna, W.L., Washington, R., Boyette, A., Strickland, P., Dillon, A., Kaprielian, Z., Tessier-Lavigne, M., and Hinck, L. (2006). UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1. Nat. Neurosci. *9*, 996–998.

Xu, K., Wu, Z., Renier, N., Antipenko, A., Tzvetkova-Robev, D., Xu, Y., Minchenko, M., Nardi-Dei, V., Rajashankar, K.R., Himanen, J., et al. (2014). Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism. Science (80-.). *344*, 1275–1279.

Yamagishi, S., Yamada, K., Sawada, M., Nakano, S., Mori, N., Sawamoto, K., and Sato, K. (2015). Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain. Front. Cell. Neurosci. *9*, 1–9.

Yamakawa, K., Huot, Y.K., Haendelt, M.A., Hubert, R., Chen, X.N., Lyons, G.E., and Korenberg, J.R. (1998). DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. Hum. Mol. Genet. *7*, 227–237.

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.

Yebra, M., Montgomery, A.M.P., Diaferia, G.R., Kaido, T., Silletti, S., Perez, B., Just, M.L., Hildbrand, S., Hurford, R., Florkiewicz, E., et al. (2003). Recognition of the neural chemoattractant netrin-1 by integrins α6β4 and α3β1 regulates epithelial cell adhesion and migration. Dev. Cell *5*, 695–707.

Yee, K.T., Simon, H.H., Tessier-Lavigne, M., and O'Leary, D.D.. (1999). Extension of Long Leading Processes and Neuronal Migration in the Mammalian Brain Directed by the Chemoattractant Netrin-1. Neuron *24*, 607–622.

Yin, X., Farin, H.F., van Es, J.H., Clevers, H., Langer, R., and Karp, J.M. (2014). Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. Nat. Methods *11*, 106–112.

Yin, Y., Sanes, J.R., and Miner, J.H. (2000). Identification and expression of mouse netrin-4. Mech. Dev. *96*, 115–119.

Yung, A.R., Nishitani, A.M., and Goodrich, L. V. (2015). Phenotypic analysis of mice completely lacking Netrin-1. Development 3686–3691.

Zacharias, W.J., Madison, B.B., Kretovich, K.E., Walton, K.D., Richards, N., Udager, A.M., Li, X., and Gumucio, D.L. (2011). Hedgehog signaling controls homeostasis of adult intestinal smooth muscle. Dev. Biol. *355*, 152–162.

Zhong, Y., Takemoto, M., Fukuda, T., Hattori, Y., Murakami, F., Nakajima, D., Nakayama, M., and Yamamoto, N. (2004). Identification of the genes that are expressed in the upper layers of the neocortex. Cereb. Cortex *14*, 1144–1152.

Zhu, Y., Li, Y., Haraguchi, S., Yu, M., Ohira, M., Ozaki, T., Nakagawa, A., Ushijima, T., Isogai, E., Koseki, H., et al. (2013). Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. J. Clin. Invest. *123*, 2935–2947.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Floor plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance.

Chloé Dominici[1,†,] Juan Antonio Moreno-Bravo[1,†,] Sergi Roig Puiggros[1,2], Quentin Rappeneau[1] , Nicolas Rama[2] , Pauline Vieugue[2] , Agnes Bernet[2] , Patrick Mehlen[2*] and Alain Chédotal [1*]

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la 10 Vision, 17 Rue Moreau, 75012 Paris, France.
[2] Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

[†] These authors contributed equally
*corresponding authors: alain.chedotal@inserm.fr ,
patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

LETTER

doi:10.1038/nature22331

Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance

Chloé Dominici[1]*, Juan Antonio Moreno-Bravo[1]*, Sergi Roig Puiggros[1,2], Quentin Rappeneau[1], Nicolas Rama[2], Pauline Vieugue[2], Agnès Bernet[2], Patrick Mehlen[2]§ & Alain Chédotal[1]§

Netrin-1 is an evolutionarily conserved, secreted extracellular matrix protein involved in axon guidance at the central nervous system midline[1,2]. Netrin-1 is expressed by cells localized at the central nervous system midline, such as those of the floor plate in vertebrate embryos[1,3]. Growth cone turning assays and three-dimensional gel diffusion assays have shown that netrin-1 can attract commissural axons[2,4–6]. Loss-of-function experiments further demonstrated that commissural axon extension to the midline is severely impaired in the absence of netrin-1 (refs 3, 7–9). Together, these data have long supported a model in which commissural axons are attracted by a netrin-1 gradient diffusing from the midline. Here we selectively ablate netrin-1 expression in floor-plate cells using a *Ntn1* conditional knockout mouse line. We find that hindbrain and spinal cord commissural axons develop normally in the absence of floor-plate-derived netrin-1. Furthermore, we show that netrin-1 is highly expressed by cells in the ventricular zone, which can release netrin-1 at the pial surface where it binds to commissural axons. Notably, *Ntn1* deletion from the ventricular zone phenocopies commissural axon guidance defects previously described in *Ntn1*-knockout mice. These results show that the classical view that attraction of commissural axons is mediated by a gradient of floor-plate-derived netrin-1 is inaccurate and that netrin-1 primarily acts locally by promoting growth cone adhesion.

Mouse commissural neurons are diverse and comprise many subtypes[10]. In the midbrain, hindbrain and spinal cord, commissural neurons transiently express the Robo3 receptor[11,12] (Fig. 1a). At embryonic day 9.5 (E9.5), the first commissural neurons cross the floor plate[13], where netrin-1 expression is the highest[4,7,14]. As previously shown, *Ntn1* mRNA is also expressed in neural progenitors of the basal plate ventricular zone (Figs 1b, 2 and Extended Data Figs 1 and 2). Netrin-1 protein is localized at the floor plate (labelled with Alcam/BEN—a floor plate marker[12]) and along commissural axons (Fig. 1c and Extended Data Figs 1 and 2). The netrin-1 antibody used to identify the protein does not cross-react with netrin-3 (Extended Data Fig. 1d).

We sought to determine whether dorsal netrin-1 is produced locally in the ventricular zone, or if it diffuses from the floor plate. We detected netrin-1 on the radial processes and basal end-feet of ventricular zone neural progenitors, which are bipolar cells extending from the ventricular surface to the pia (Fig. 1 and Extended Data Fig. 1). We confirmed the presence of netrin-1 in the ventricular zone precursors using *Ntn1* hypomorphs ($Ntn1^{\beta geo}$) in which netrin-1 is fused to β-galactosidase (β-gal) and trapped into endosomes (Fig. 1d)[7]. In $Ntn1^{\beta geo/+}$ embryos, netrin-1$^+$/β-gal$^+$ puncta are observed in the floor plate and ventricular zone, but not in commissural neurons. However, commissural axons were netrin-1-immunoreactive (due to the wild-type allele; Fig. 1d and Extended Data Fig. 1c). The specificity of the netrin-1 axonal immunolabelling is supported by its absence in $Ntn1^{\beta geo/\beta geo}$ embryos (Fig. 1e). A ventricular source of netrin-1 was confirmed with nestin, a marker of neural progenitors. At E10.5–E13, neural progenitor processes extending to the pial surface co-expressed netrin-1 and nestin (Fig. 1f and Extended Data Figs 1g and 4h). This suggests that in the dorsal hindbrain and spinal cord, netrin-1 originates from ventricular zone precursors rather than floor plate.

We next sought to clarify the source of netrin-1 that pioneer commissural axons encounter at the onset of their extension. At E9–E9.5, the first Robo3$^+$ commissural growth cones extend in the marginal layer of the hindbrain, where netrin-1 expression is high (Fig. 1g). This was confirmed using a $Ptf1a{:}cre^{ERT2}{;}Rosa^{Tom}$ reporter line[15] (Fig. 1h). Ptf1a is expressed by diverse hindbrain commissural neuron progenitors, including those of the inferior olivary nucleus[16] (ION; see below). Importantly, commissural axon guidance errors were observed in $Ntn1^{\beta geo/\beta geo}$ hypomorphs embryos as soon as growth cones appeared (Fig. 1i). These results suggest that netrin-1 is released or transported locally by neural progenitors to the pial surface and guides pioneer commissural axons by promoting their initial growth at the central nervous system periphery in the first stages of their extension. Netrin-1 accumulation on commissural axons might create a permissive pathway for follower axons.

The role of floor-plate-derived *Ntn1* in mouse commissural axon guidance *in vivo* is supported by the phenotypic analysis of *Ntn1* hypomorphs[7] and *Ntn1*-null embryos[8,9]. To identify the critical source of netrin-1 for mediating commissural axon guidance, we crossed a novel netrin-1 conditional mouse line ($Ntn1^{fl/fl}$) to three mouse lines expressing Cre recombinase ubiquitously, only in the floor plate, or in all the neural tube except the floor plate. In homozygous $Ntn1^{-/-}$ embryos, in which netrin-1 was ubiquitously deleted, no *Ntn1* mRNA is detectable in the hindbrain or spinal cord (Fig. 1j and not shown), in contrast to the residual expression observed in $Ntn1^{\beta geo/\beta geo}$ hypomorphs (Extended Data Fig. 2a–c). Likewise, netrin-1 immunolabelling is abrogated in E11–E13 $Ntn1^{-/-}$ embryos (Fig. 1j and Extended Data Fig. 1h, i). Netrin-1 immunoreactivity persisted on commissural axons in the absence of permeabilization, suggesting that some netrin-1 exists at the extracellular surface (Extended Data Fig. 1j). This suggests that commissural axons and precursors could accumulate or internalize netrin-1, possibly in a Dcc-dependent manner as shown in *Drosophila*[17]. Accordingly, Dcc is not only expressed by E11 and E13 commissural axons, but also by neural progenitors in the hindbrain (Fig. 1k). The specificity of the Dcc antibody was demonstrated by the lack of staining in *Dcc*-knockout embryos[18] (Extended Data Fig. 1k). In the E13 cerebellar plate (Fig. 1l), 3 h pulse labelling with EdU (5-ethynyl-2′-deoxyuridine) and immunostaining for the stem cell marker Sox2 confirmed that neural progenitors do express Dcc (Fig. 1m). Radial progenitor processes extended normally in $Ntn1^{-/-}$ embryos (Extended Data Fig. 1l).

Next, we analysed the consequences of floor-plate-specific deletion of netrin-1 on commissural axon development (Figs 2 and 3). As

[1]Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 Rue Moreau, 75012 Paris, France. [2]Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.
*These authors contributed equally to this work.
§These authors contributed equally to this work.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

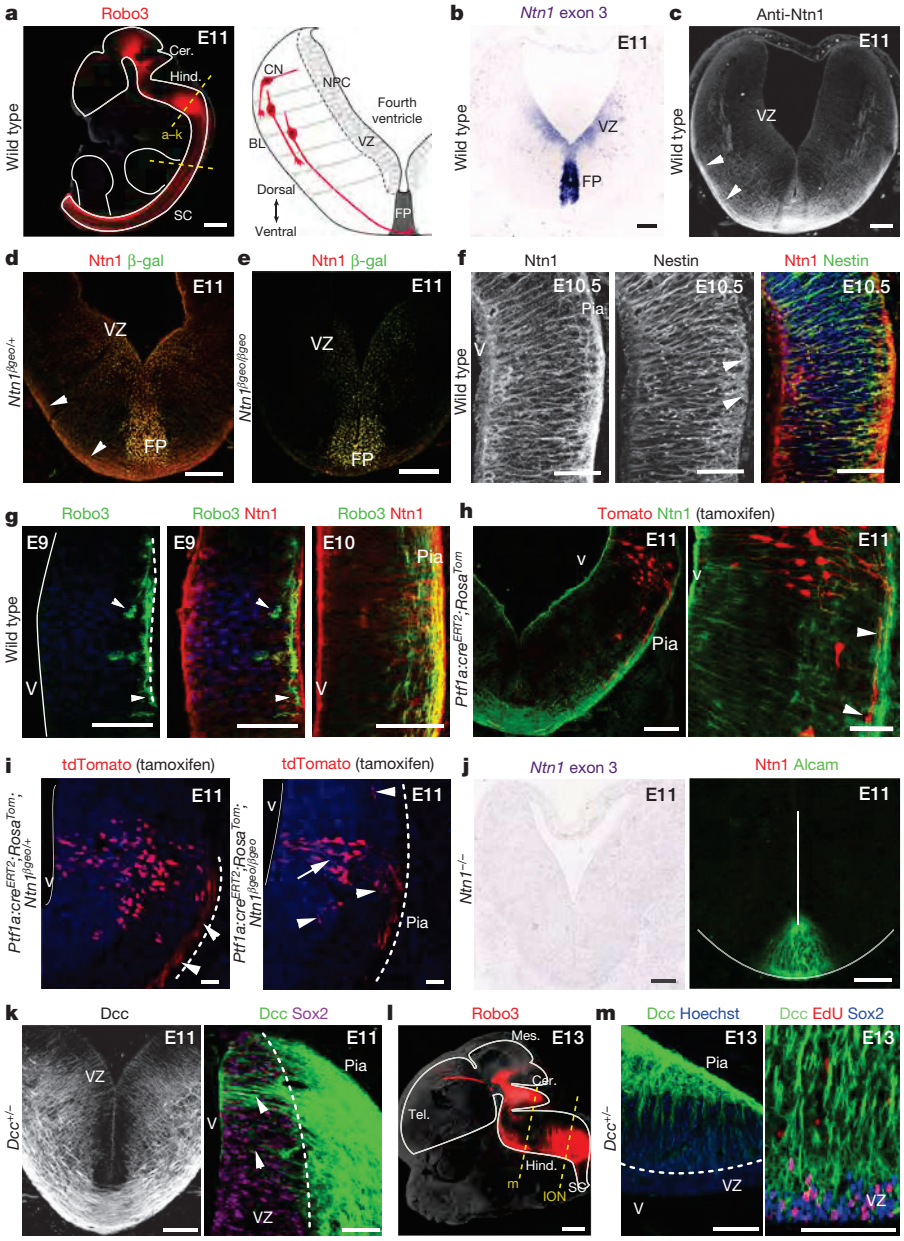


Figure 1 | Netrin-1 is expressed by ventricular zone neural progenitors. **a**, Robo3^{+} commissural axons (left) and hindbrain schematic (right). Dashed lines indicate section levels. BL, basal lamina; Cer., cerebellum; CN, commissural neurons; FP, floor plate; Hind., hindbrain; NPC, neural precursors; SC, spinal cord; VZ, ventricular zone. **b**, In wild-type mice, the mRNA encoding the third exon of *Ntn1*, floxed in the conditional knockout, is expressed in the ventricular zone and floor plate ($n = 6$). **c**, Netrin-1 protein is expressed in the floor plate and commissural axons (arrowheads; $n = 6$). **d**, **e**, In *Ntn1*$^{\beta geo/+}$ (**d**) and *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ (**e**) mice, the Ntn1–β-gal protein is expressed in the ventricular zone and floor plate ($n = 6$ and 6). Commissural axons (arrowheads) are netrin-1^{+} but β-gal^{-}. **f**, Netrin-1 is detected in nestin^{+} radial processes extending to the pia (arrowheads; $n = 6$). **g**, The first Robo3^{+} commissural growth cones (arrowheads; $n = 6$) extend under the pia (dotted line) in a netrin-1-rich domain. V, ventricle. **h**, **i**, tdTomato^{+} inferior olivary growth cones (arrowheads) extend ventrally in a netrin-1-rich domain in *Ptf1a:cre*^{ERT2};*Rosa*^{Tom} and *Ntn1*$^{\beta geo/+}$ mice ($n = 6$). Mice were injected with tamoxifen at E10. In *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ mice ($n = 6$), axons (arrowheads) stall at the pial surface and some enter the ventricular zone (arrow). **j**, Absence of *Ntn1* mRNA and protein ($n = 6$ each) in *Ntn1*$^{-/-}$ hindbrain. **k**, Dcc labels hindbrain commissural axons and radial processes (arrowheads) extending from the Sox2^{+} ventricular zone ($n = 6$). **l**, Robo3^{+} commissural axons at E13. Tel., telencephalon; Mes., mesencephalon. **m**, Sox2^{+}/EdU^{+} cerebellar ventricular zone progenitors express Dcc ($n = 6$). Scale bars, 500 μm (**a**, **l**); 50 μm (**g**, **h** right panel, **m**); 100 μm (all other panels).

performed previously[19], we used a mouse line expressing Cre recombinase fused to green fluorescent protein (GFP) under the control of the sonic hedgehog (Shh) promoter. Crossing *Shh:cre* and *Rosa*^{Tom} lines showed that Cre was active in the E9 floor plate, before commissural axons reach it (Fig. 2a, d). Neither tdTomato nor GFP were expressed in the ventricular zone (Fig. 2j). In *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos, *Ntn1* mRNA was ablated from the floor plate all along the spinal cord and hindbrain at E9, E10, E11 and E13 (Fig. 2b, c, e, f, k). Netrin-1 protein was also eliminated from the floor plate at E9 but maintained in the ventricular zone (Fig. 2g, h). Netrin-1 was not detected in E9 *Ntn1*$^{-/-}$ embryos (Fig. 2i). Therefore, in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos, netrin-1 ablation well precedes midline crossing. The absence of netrin-1 from *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ floor plate was confirmed at E10–E13 (Fig. 2k–m and Extended Data Fig. 2a–d). Western blot analysis of floor plate extracts confirmed that netrin-1 is undetectable in *Ntn1*$^{-/-}$ embryos and almost completely absent in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos compared to controls (Extended Data Fig. 2h, i; for gel source data see Supplementary Fig. 1). However, netrin-1 was still present in commissural axons, ventricular

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

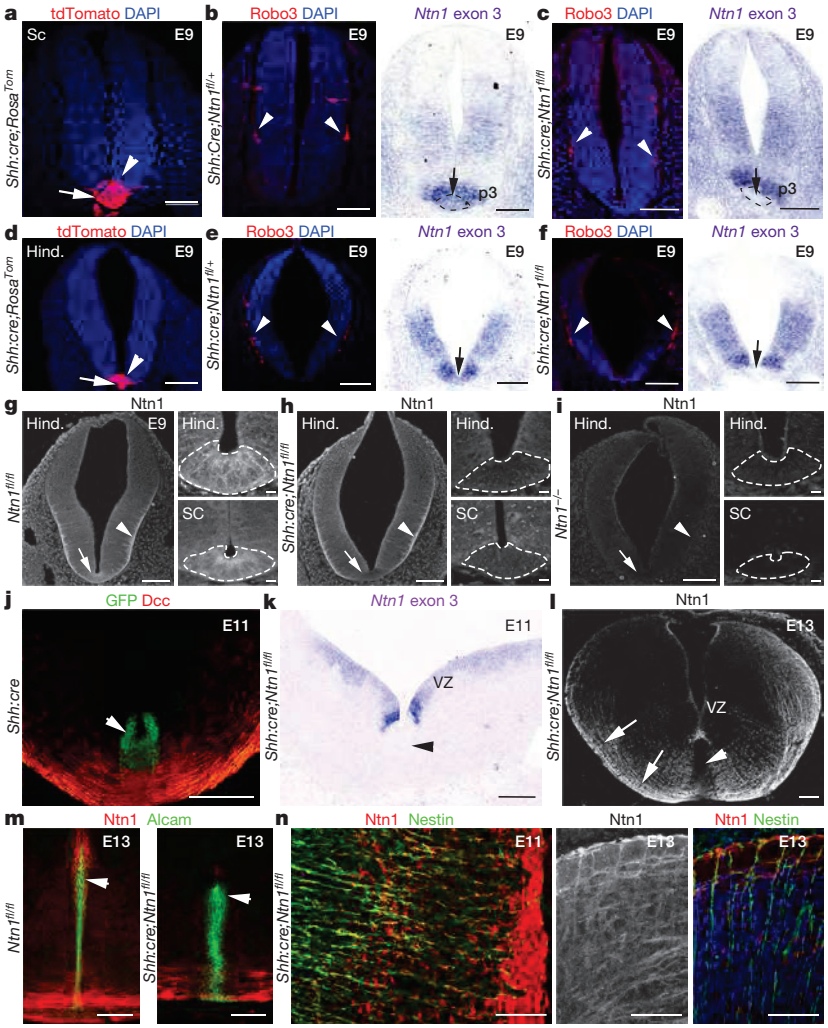


Figure 2 | Floor-plate-specific deletion of *Ntn1* in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos. a–f, tdTomato is expressed in the floor plate (arrowhead) and notochord (arrow) in *Shh:cre;Rosa*^{Tom} spinal cord (**a**) and hindbrain (**d**) ($n = 6$). Robo3^{+} commissural axons (arrowheads in **b**, **c**, **e** and **f**) have not reached the midline. *Ntn1* mRNA is present in the floor plate (short arrows) in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/+}$ but not in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice. *Ntn1* mRNA is also found in the progenitor domain p3. **g–i**, Netrin-1 is present in the floor plate (arrow) and pial surface (arrowhead) in wild-type mice (**g**; $n = 6$). In *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice (**h**; $n = 6$), netrin-1 is absent from the floor plate (arrow and dotted lines) but present at the pial surface (arrowhead). Netrin-1 is completely absent in *Ntn1*$^{-/-}$ mice (**i**; $n = 6$). **j**, In *Shh:cre* mice, GFP is present in the floor plate (arrowhead; $n = 6$) and commissural axons express Dcc. **k**, *Ntn1* is absent from the floor plate but maintained in the ventricular zone in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice ($n = 6$). **l–n**, In *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice, the floor plate (arrowheads in **l**) lacks netrin-1, but both commissural axons (short arrows in **l**) and nestin^{+} neural progenitors (**n**; $n = 6$) express it. Alcam expression is unchanged in the floor plate (arrowheads in **m**; $n = 6$). Scale bars are 100 μm except on the higher magnifications of **g**, **h** and **i** where they are 10 μm.

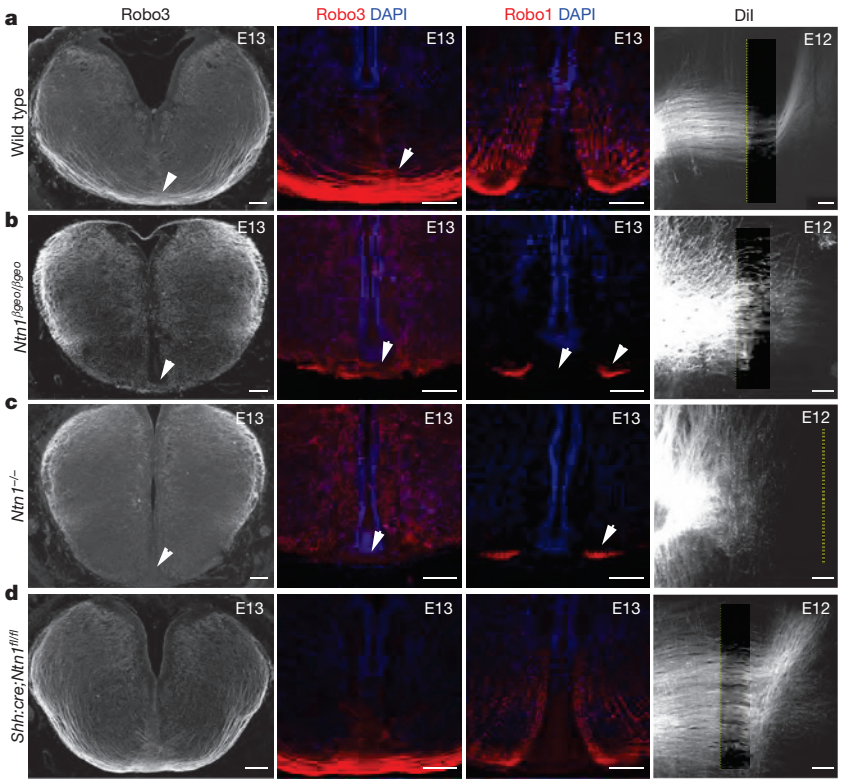


Figure 3 | Commissural axons develop normally without floor-plate-derived netrin-1. Coronal sections and flat mounts of E12 and E13 hindbrains. **a**, In wild-type mice, Robo3^{+} commissural axons cross the floor plate (arrowheads) and Robo1 is expressed by axons that have crossed successfully ($n = 7$). DiI-labelled commissural axons cross the midline (dotted lines) and turn longitudinally ($n = 5$). **b**, In *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ mice, midline crossing is reduced (arrowheads) and most DiI-labelled axons fail to cross ($n = 3$). **c**, Crossing is strongly reduced in *Ntn1*$^{-/-}$ ($n = 6$). Robo1 is still expressed on the few axons that do successfully cross (arrowheads in **b** and **c**; $n = 6$). **d**, Commissures look similar to controls in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice ($n = 6$). Scale bars, 100 μm.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

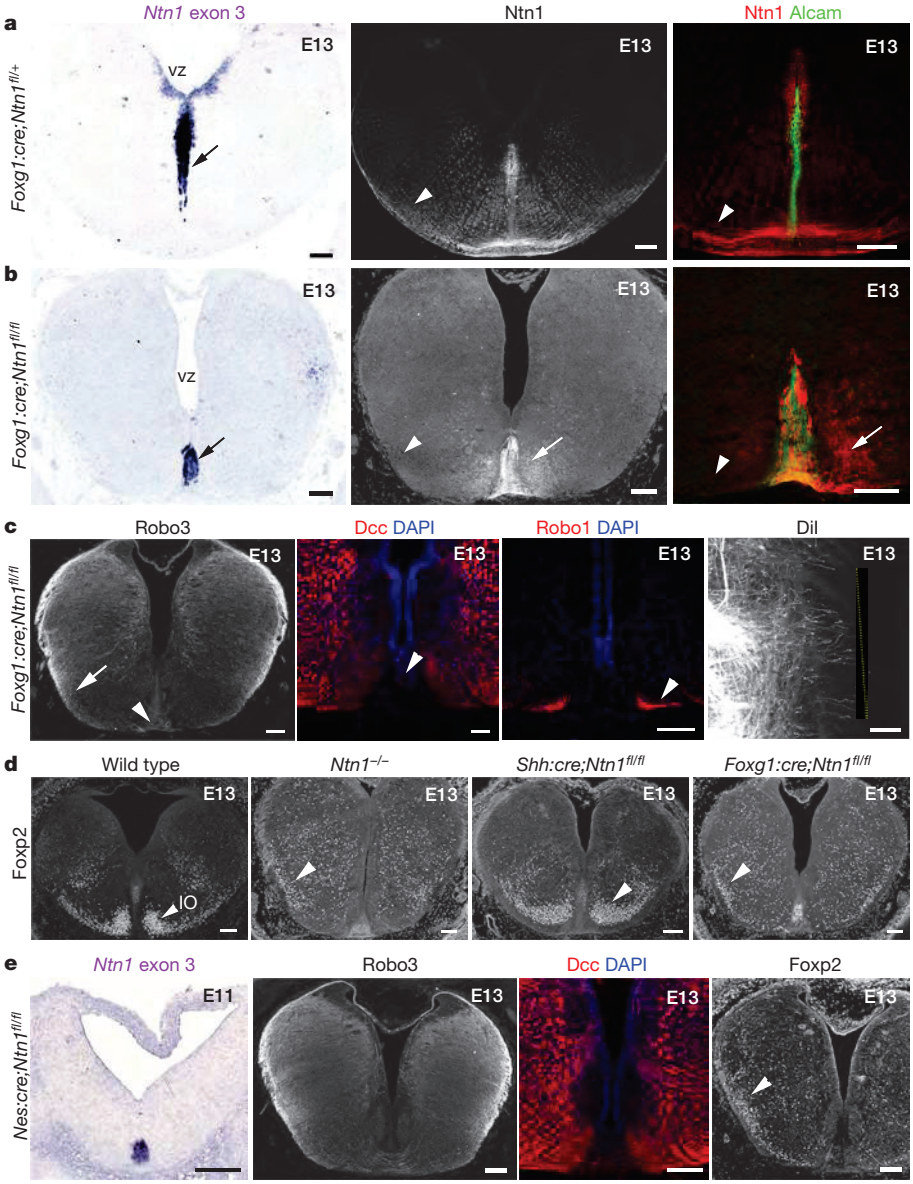


Figure 4 | Ventricular-zone-derived netrin-1 controls commissural axon guidance. a, **b**, Ventricular-zone-derived netrin-1 is absent in *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice and expression by commissural axons is reduced (arrowheads) (**b**) compared to *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/+}$ mice (**a**). Netrin-1 is still present in the floor plate (short arrows; 5 of 5 mice for each genotype). **c**, A few commissural axons (arrowheads; $n = 6$) cross the midline (arrow) and DiI-labelled axons fail to cross (dotted line; $n = 6$). **d**, In wild-type Foxp2^{+} inferior olivary (IO) neurons have started to reach the floor plate (arrowhead; $n = 7$). Most inferior olivary neurons fail to migrate ventrally (arrowheads; $n = 6$) in *Ntn1*$^{-/-}$ and *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice, unlike in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice ($n = 7$). **e**, *Ntn1* exon 3 expression in *Nes:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice ($n = 6$). Midline crossing and inferior olivary neuron migration are impaired ($n = 6$). Scale bars, 100 μm.

zone and neural progenitor processes (Fig. 2l–n and Extended Data Fig. 2f, g). To determine if the absence of floor-plate netrin-1 perturbed midline crossing, we visualized commissural axons in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos with immunostaining for neurofilament, Robo3, Dcc and Robo1. Robo3 is expressed by pre-crossing axons[11], Dcc before and after crossing[11], and Robo1 after crossing[11]. As previously described, the number of axons crossing the midline was severely reduced in the hindbrain and spinal cord in E13 and E11 *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ embryos compared to controls (*Shh:cre;Ntn1*$^{fl/+}$, *Ntn1*$^{\beta geo/+}$ or wild type; Fig. 3a, b and Extended Data Fig. 3a, b). This was confirmed by the parallel reduction in Robo1 staining. As described[8,9], this phenotype was exacerbated in *Ntn1*$^{-/-}$ embryos in which midline crossing was almost completely abolished (Fig. 3c and Extended Data Fig. 3c). Remarkably, midline crossing was not perturbed in E10–E13 *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos in the hindbrain, nor at any levels of the spinal cord (Fig. 3d and Extended Data Fig. 3d, e and data not shown). At E12, 1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindocarbocyanine (DiI) injection in 'open book' hindbrains and spinal cords (that is, preparations of anatomical samples that have been dissected to unfold and lay flat, much like an open book) showed that commissural axons cross the midline and turn longitudinally in wild-type and *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos, whereas crossing is severely perturbed in *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ and *Ntn1*$^{-/-}$ embryos (Fig. 3 and not shown). Therefore, floor-plate-derived netrin-1 is not required for commissural axon guidance to the floor plate.

To confirm this result, we crossed *Ntn1*$^{fl/fl}$ mice to lines expressing Cre in the hindbrain. In *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos, *Ntn1* mRNA is undetectable in the hindbrain ventricular zone, but highly expressed in the floor plate (Fig. 4a, b). Accordingly, netrin-1 protein is almost absent from commissural axons and pial surface of E11 and E13 *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mouse hindbrains (Fig. 4a, b and Extended Data Fig. 4a, b). Netrin-1 immunoreactivity in the floor plate and its vicinity suggests that netrin-1 does not diffuse far from it. A *Rosa*^{Tom} reporter

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

line confirmed that *Foxg1:cre* drives Cre expression in most of the hindbrain but only a few floor-plate cells (Extended Data Fig. 4c). At E13, the number of hindbrain commissures are strongly reduced in *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos, phenocopying *Ntn1*$^{-/-}$ embryos (Fig. 4c and Extended Data Fig. 4g and data not shown). DiI tracing of hindbrain commissural axons confirms the absence of crossing at E13 (Fig. 4c). Since ventricular zone netrin-1 persisted in *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ spinal cord, we could not determine if the ventricular zone is also the source of netrin-1 for spinal cord commissural axons (Extended Data Fig. 4d, e). We next studied the development of ION neurons, whose migration from the dorsal hindbrain to the floor plate is perturbed in *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ embryos[20] (see also Fig. 1i). At E13, Foxp2^{+} migrating ION neurons have started to reach the floor plate in wild-type mice[21] (Fig. 4d). By contrast, in *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ (Extended Data Fig. 4f) and *Ntn1*$^{-/-}$ embryos (Fig. 4d) most ION neurons either fail to migrate ventrally or migrate inside the hindbrain (Figs 4d and 1i). Similar defects occurred in *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos, but the ION neurons migrated normally in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos (Fig. 4d). The role of ventricular-zone-derived netrin-1 was further investigated in E11 *Nes:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos[22], which lack *Ntn1* mRNA in the ventricular zone but do express it in the floor plate (Fig. 4e). In this mutant, a severe reduction of midline crossing was observed (Fig. 4e) and ION neuron migration was abnormal (Fig. 4e).

Netrin-1 was initially proposed to be a diffusible cue, but sequence similarities with laminins and X-ray structural analyses have strengthened the view that netrin-1 is an extracellular matrix protein that influences cell adhesion[4,23]. This raised questions about the ability of netrin-1 to act simply as a soluble cue. Accordingly, studies in *Drosophila* showed that the expression of a membrane-tethered netrin-1 in midline glia rescues midline crossing[24]. Likewise, in the *Drosophila* visual system, interaction between netrin and Frazzled (the orthologue of Dcc) promotes attachment to target cells rather than chemoattraction[25]. In the mouse, netrin-1 attachment to a substrate is required for commissural axon extension[26]. Here we show that during their ipsilateral extension, commissural axons respond to netrin-1 produced dorsally by neural progenitors in the hindbrain and spinal cord and that floor-plate netrin-1 is not essential. The presence of netrin-1 in dorsal spinal cord extracts[14] most likely reflects its local production by neural progenitors rather than its diffusion from the floor plate. We propose that netrin-1 promotes growth cone attachment and haptotaxis, anchoring pioneer commissural axons close to the pial surface (Extended Data Fig. 4h).

Our results suggest that long-range attraction by gradient of chemoattractants might not be a major guidance mechanism for commissural axons, as previously proposed[27]. The role of floor plate netrin-1 is still unclear as *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mice are viable without any obvious behavioural defects. By contrast, *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ and *Nes:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ mutants die at birth. Yet, in the spinal cord, floor-plate- and ventricular-zone-derived netrin-1 might act redundantly. In light of our results it will be important to consider floor-plate-independent cellular mechanisms of ipsilateral guidance of commissural axons.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 20 October 2016; accepted 4 April 2017.
Published online 26 April 2017.

1. Serafini, T. *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* **78,** 409–424 (1994).
2. Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G. & Hedgecock, E. M. UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* **9,** 873–881 (1992).
3. Mitchell, K. J. *et al.* Genetic analysis of netrin genes in *Drosophila*: netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17,** 203–215 (1996).
4. Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R. & Tessier-Lavigne, M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78,** 425–435 (1994).
5. Ming, G. L. *et al.* cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* **19,** 1225–1235 (1997).
6. de la Torre, J. R. *et al.* Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* **19,** 1211–1224 (1997).
7. Serafini, T. *et al.* Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87,** 1001–1014 (1996).
8. Yung, A. R., Nishitani, A. M. & Goodrich, L. V. Phenotypic analysis of mice completely lacking netrin 1. *Development* **142,** 3686–3691 (2015).
9. Bin, J. M. M. *et al.* Complete loss of netrin-1 results in embryonic lethality and severe axon guidance defects without increased neural cell death. *Cell Reports* **12,** 1099–1106 (2015).
10. Chédotal, A. Development and plasticity of commissural circuits: from locomotion to brain repair. *Trends Neurosci.* **37,** 551–562 (2014).
11. Sabatier, C. *et al.* The divergent Robo family protein Rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* **117,** 157–169 (2004).
12. Marillat, V. *et al.* The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* **43,** 69–79 (2004).
13. Wentworth, L. E. The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. II. A Golgi analysis of sensory, commissural, and association cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* **222,** 96–115 (1984).
14. Kennedy, T. E., Wang, H., Marshall, W. & Tessier-Lavigne, M. Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *J. Neurosci.* **26,** 8866–8874 (2006).
15. Fleming, J. T. *et al.* The Purkinje neuron acts as a central regulator of spatially and functionally distinct cerebellar precursors. *Dev. Cell* **27,** 278–292 (2013).
16. Renier, N. *et al.* Genetic dissection of the function of hindbrain axonal commissures. *PLoS Biol.* **8,** e1000325 (2010).
17. Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E. & Hotta, Y. The *Drosophila* Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature* **406,** 886–889 (2000).
18. Fazeli, A. *et al.* Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* **386,** 796–804 (1997).
19. Joksimovic, M. *et al.* Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12,** 125–131 (2009).
20. Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M. & Sotelo, C. Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J. Neurosci.* **19,** 4407–4420 (1999).
21. Fujita, H. & Sugihara, I. FoxP2 expression in the cerebellum and inferior olive: development of the transverse stripe-shaped expression pattern in the mouse cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* **520,** 656–677 (2012).
22. Tronche, F. *et al.* Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* **23,** 99–103 (1999).
23. Grandin, M. *et al.* Structural decoding of the Netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers. *Cancer Cell* **29,** 173–185 (2016).
24. Brankatschk, M. & Dickson, B. J. Netrins guide *Drosophila* commissural axons at short range. *Nat. Neurosci.* **9,** 188–194 (2006).
25. Akin, O. & Zipursky, S. L. Frazzled promotes growth cone attachment at the source of a Netrin gradient in the *Drosophila* visual system. *eLife* **5,** e20762 (2016).
26. Moore, S. W., Biais, N. & Sheetz, M. P. Traction on immobilized netrin-1 is sufficient to reorient axons. *Science* **325,** 166 (2009).
27. Matise, M. P., Lustig, M., Sakurai, T., Grumet, M. & Joyner, A. L. Ventral midline cells are required for the local control of commissural axon guidance in the mouse spinal cord. *Development* **126,** 3649–3659 (1999).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements We thank C. Wright for the *Ptf1a:cre*^{ERT2} line and P. Charnay for the *Krox20:cre* line. We also thank A. Kolodkin and R. Vigouroux for critical reading of the manuscript and S. Fouquet of the Vision Institute imaging facility for its technical support. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE13-0004-01) (A.C.). It was performed in the frame of the LABEX LIFESENSES (reference ANR-10-LABX-65) supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02 (A.C.). This work was also supported by grants from INCA, ERC, ANR and Fondation Bettencourt (P.M.). C.D. was recipient of a PhD fellowship from the Fondation pour la recherche médicale.

Author Contributions A.C., A.B. and P.M. designed the experiments. C.D., J.A.M.B., N.R., P.V., Q.R. and S.R.P. performed the experiments. A.C., C.D. and J.A.M.B. prepared the figures. A.C. and P.M. supervised the project and wrote the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.C. (alain.chedotal@inserm.fr) and P.M. (patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr).

Reviewer Information *Nature* thanks T. Gomez and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

METHODS

Mouse strains and genotyping. *Ntn1*$^{\beta geo}$(ref. 7) and *Dcc* (ref. 18) knockout lines have previously been described and genotyped by PCR. The *Ntn1* conditional knockout was created (Genoway) by inserting two *loxP* sites flanking the coding sequences containing both the principal ATG (based on *Ntn1* cDNA sequence NM_008744) and the cryptic ATG (based on *Ntn1* cDNA: BC141294) and the alternative promoter described in intron 3 (ref. 28).

The targeting vector was constructed as follows: three fragments of 2.1 kb, 3.4 kb and 4.6 kb (respectively, the 5′, floxed and 3′ arms) were amplified by PCR using 129Sv/Pas ES DNA as a template and sequentially subcloned into the pCR4-TOPO vector (Invitrogen). These fragments were used for the construction of the targeting vector in which a FRT-flanked neomycin cassette was inserted in 5′ of the *loxP*-flanked region. The linearized construct was electroporated into 129Sv/Pas mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and further confirmed by Southern blot analysis both with a neomycin and a 5′ external probe. The positive ES cell clones were injected into C57BL/6J blastocysts and gave rise to male chimaeras with a significant ES cell contribution. Breeding was established with C57BL/6 mice expressing the Flp-recombinase, to produce the heterozygous *Ntn1* conditional knockout line devoid of the neomycin cassette. To generate a null allele of *Ntn1*, *Ntn1*$^{fl/fl}$ mice were crossed to *Krox20:cre* mice, which express Cre recombinase in the male and female germline after sexual maturity[29]. To ablate netrin-1 expression in the floor plate we used the *Shh:cre* line[30] (Jackson laboratories). In this line, the eGFP reporter was also inserted in the *Shh* locus. Lastly, we crossed *Ntn1*$^{fl/fl}$ mice to *Foxg1:cre* mice[31] and *Nes:cre* mice[22] (Jackson laboratories). The Ai9 *Rosa*^{tdTomato} reporter line (*Rosa*^{Tom}; Jackson Laboratories) was used to monitor Cre expression. Developing inferior olivary neurons were visualized by crossing the *Rosa*^{Tom} line with the *Ptf1a:cre*^{ERT2} line[15]. They were also further crossed to *Ntn1*$^{\beta geo}$ mice. All mice are kept in C57BL/6 background. The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0.5 (E0.5). Mice were anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg). All animal procedures were carried out in accordance to institutional guidelines and approved by the UPMC Charles Darwin Ethics Committee. Embryos of either sex were used.

Tamoxifen injection. *Ptf1a:cre*^{ERT2}*;Rosa*^{Tom} pregnant mice were intraperitoneally injected at E10 with 1 mg of tamoxifen (Sigma-Aldrich, T-5648) dissolved in corn oil (Sigma-Aldrich, C-8267). The embryos were collected at E11.

EdU labelling. Pregnant females were injected intraperitoneally with EdU (1 mg per 10 g body weight) and killed three hours later.

The proliferating cells were visualized after immunohistochemistry using the Alexa Fluor 647 Click-iT EdU Imaging Kit (Invitrogen).

***In situ* hybridization.** Antisense riboprobes were labelled with digoxigenin-11-d-UTP (Roche Diagnostics) as described elsewhere[12], by *in vitro* transcription of cDNA of mouse *Ntn1* (ref. 7) or mouse *Ntn1* exon 3.

DiI tracing. E12-E13 hindbrains fixed in 4% PFA in an open book configuration were injected using a glass micropipette with DiI crystals or small drops of DiI (Invitrogen) diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). Samples were kept for 24 h at 37 °C in 4% PFA.

Immunohistochemistry. Embryos were fixed by immersion in 4% PFA in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4 (PFA) overnight at 4 °C. Samples were cryoprotected in a solution of 10% sucrose in 0.12 M phosphate buffer (pH 7.2), frozen in isopentane at 50 °C and then cut at 20 μm with a cryostat (Leica Microsystems). Immunohistochemistry was performed on cryostat sections after blocking in 0.2% gelatin in PBS containing 0.5% Triton-X 100 (Sigma-Aldrich). Sections were then incubated overnight with the following primary antibodies: goat anti-human Robo3 (1:250, R&D Systems AF3076), goat anti-Dcc (1:500, Santa Cruz sc-6535), goat anti-Robo1 (1:500, R&D Systems AF1749), rat anti-mouse netrin-1 (1:500, R&D Systems MAB1109), mouse anti-nestin–Alexa488 (1:1000, Abcam ab197495), mouse anti-neurofilament (1:300, DSHB 2H3), goat anti-Foxp2 (1:1000, Santa Cruz sc-21069), rabbit anti-Foxp2 (1:1000, Abcam ab16046), rabbit anti-Sox2 (1:500, Abcam ab97959), rabbit anti-βgal (1:500, Cappel 55976), goat anti-human ALCAM (1:500, R&D Systems AF656), rabbit anti-GFP (1:800, Life Technologies A11122), rabbit anti-DsRed (1:500, Clontech 632496) followed by 2 h incubation in species-specific secondary antibodies directly conjugated to fluorophores (Cy-5, Cy-3, Alexa Fluor 647 from Jackson ImmunoResearch, or from Invitrogen). For netrin-1 immunostaining, an antigen retrieval treatment was performed on the sections before to process them for immunochemistry. The sections were boiled in citrate buffer (pH 6) during 9 min. Sections were counterstained with DAPI (1:1,000, Sigma-Aldrich). In the case of netrin-1 immunostaining on non-permeabilized tissue, the Triton was removed from all the steps. Slides were scanned with a Nanozoomer (Hamamatsu) and laser scanning confocal microscope (FV1000, Olympus). Brightness and contrast were adjusted using Adobe Photoshop.

Whole-mount labelling and 3DISCO clearing. Whole-mount immunostaining and 3DISCO optical clearing procedure has been described previously[32]. 3D imaging was performed with an ultramicroscope using Inspector Pro software (LaVision BioTec).

Western blotting. HEK-293T cells (from ATCC, not authenticated, tested for mycoplasma contamination with a negative result) were transfected with pCDNA3, pCDNA3-human NTN3, pCDNA3-human NTN1 or pCDNA3-mouse Ntn1 plasmids using Fugene HD transfection reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested and lysed 36 h after transfection. Cells were lysed using RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)) and incubated for 1 h at 4 °C. Floor plates were micro-dissected from hindbrains and spinal cords from *Ntn1*$^{fl/fl}$, *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ and *Ntn1*$^{-/-}$ E11 embryos. Floor plates were lysed in RIPA buffer and incubated for 20 min at 4 °C. Protein content was determined by a BCA assay. 25 μg of total protein was loaded on a 10% Mini Protean TGX precast gel (Biorad) and blotted onto a nitrocellulose membrane (Biorad). Membranes were blocked with 5% dried milk and 3% of BSA in TBS-0.1% Tween (TBS-T) for 1 h at room temperature and incubated for 90 min at room temperature with primary antibodies: anti-actin (Sigma-Aldrich, A5060, rabbit polyclonal, 1:1,500), anti-HPRT (Abcam, ab109021, rabbit monoclonal EPR5299, 1:10,000), anti-Ntn1 (R&D Systems, MAB1109, rat monoclonal, 1:500), anti-NTN3 (Abcam, ab185200, rabbit polyclonal, 1:1,000) and anti-Slit2 (Abcam, ab134166, rabbit monoclonal, 1:400). After three washes in TBS-T, membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (1:5,000, Jackson ImmunoResearch). Detection was performed using Pierce ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific).

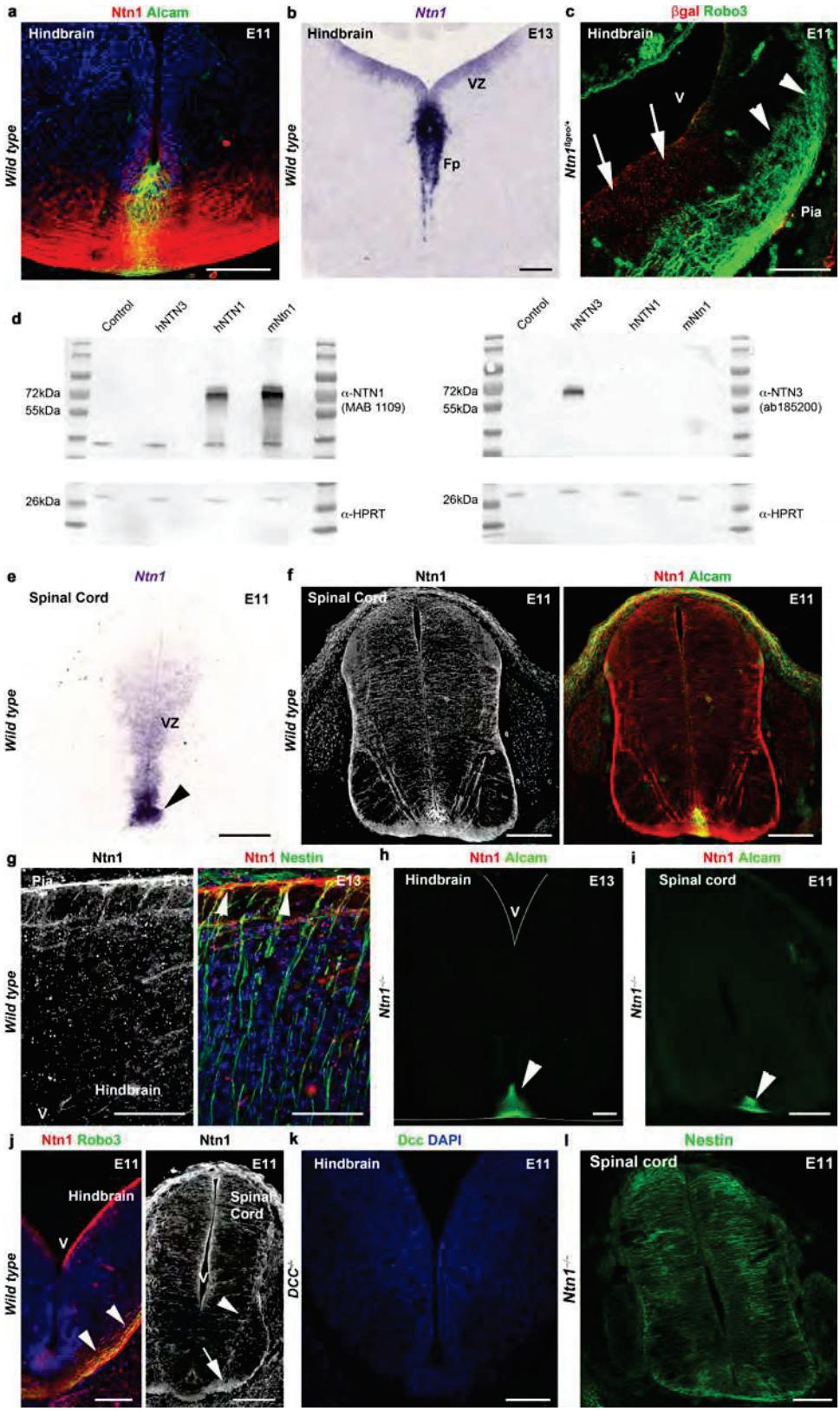
Data quantification and statistics. All data quantification was done by an observer blinded to the experimental conditions. We did not perform randomization into groups. No statistical methods were used to predetermine sample size. Data are presented as mean values ± s.e.m. Statistical significance was calculated using one-sided unpaired tests for non-parametric tendencies (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney). For western blot, at least three independent cases were quantified from independent experiments using densitometric analysis (ImageJ) by normalizing phosphorylation signals to total protein levels. The control cases were normalized to 1 and for the mutants, data were presented as mean values ± s.e.m. (0.1133 ± 0.05 for *Shh:cre; Ntn1*$^{fl/fl}$ 1 for *Ntn1*$^{fl/fl}$ and 0 for *Ntn1*$^{-/-}$). Differences were considered significant when $P < 0.05$. The thickness of hindbrain commissural bundles was quantified for each embryo on nine coronal sections. The sections were representative of three different hindbrain antero-posterior levels (three sections for each level). To minimize the developmental variations, mutant embryos and littermate controls were compared (except for *Ntn1*$^{-/-}$ embryos which were compared to wild-type embryos). The ratio of the commissural axon bundle size was normalized to controls. Six embryos of each genotype were quantified, from at least two different litters. Data are presented as mean ± s.e.m.: wild type: Dcc, 0.994 ± 0.052; Robo3, 1 ± 0.061; neurofilament, 1 ± 0.048; *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$: Dcc, 0.416 ± 0.013; Robo3, 0.402 ± 0.007; neurofilament, 0.416 ± 0.01; *Ntn1*$^{-/-}$: Dcc, 0.091 ± 0.008; Robo3, 0.061 ± 0.008; neurofilament, 0.104 ± 0.007; *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$: Dcc, 1.051 ± 0.011; Robo3, 1.084 ± 0.028; neurofilament, 1.063 ± 0.019; and *Foxg1:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$: Dcc, 0.411 ± 0.053; Robo3, 0.369 ± 0.056; neurofilament, 0.416 ± 0.050.

Differences were considered significant when $P < 0.05$. Statistical analyses of the mean and variance were performed with Prism 7 (GraphPad Software).

Data availability. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

28. Delloye-Bourgeois, C. *et al.* Nucleolar localization of a netrin-1 isoform enhances tumor cell proliferation. *Sci. Signal.* **5,** ra57 (2012).
29. Voiculescu, O., Charnay, P. & Schneider-Maunoury, S. Expression pattern of a *Krox-20/Cre* knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis* **26,** 123–126 (2000).
30. Harfe, B. D. *et al.* Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118,** 517–528 (2004).
31. Hébert, J. M. & McConnell, S. K. Targeting of Cre to the *Foxg1* (*BF-1*) locus mediates *loxP* recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev. Biol.* **222,** 296–306 (2000).
32. Belle, M. *et al.* A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. *Cell Reports* **9,** 1191–1201 (2014).

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

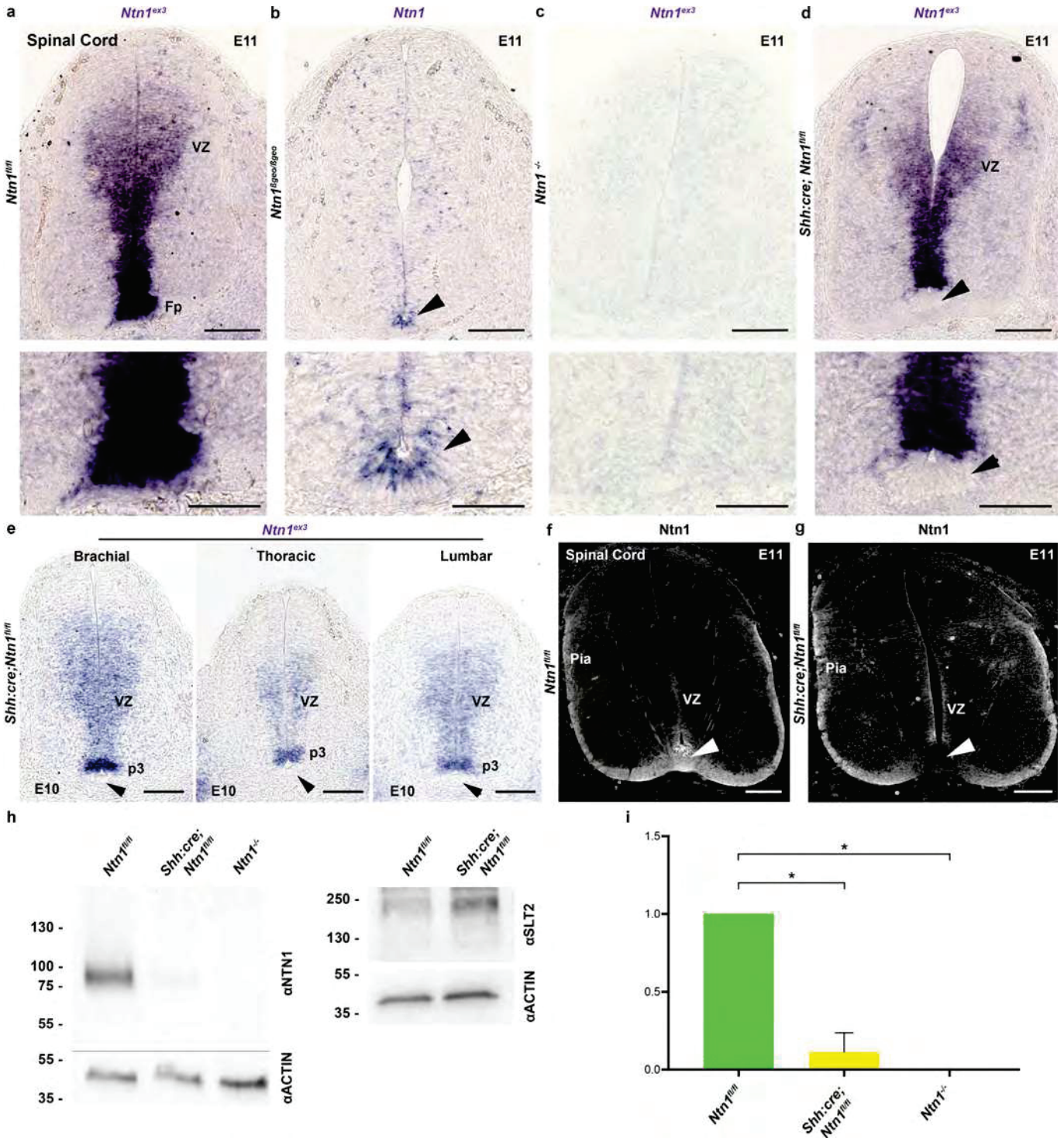


Extended Data Figure 1 | See next page for caption.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

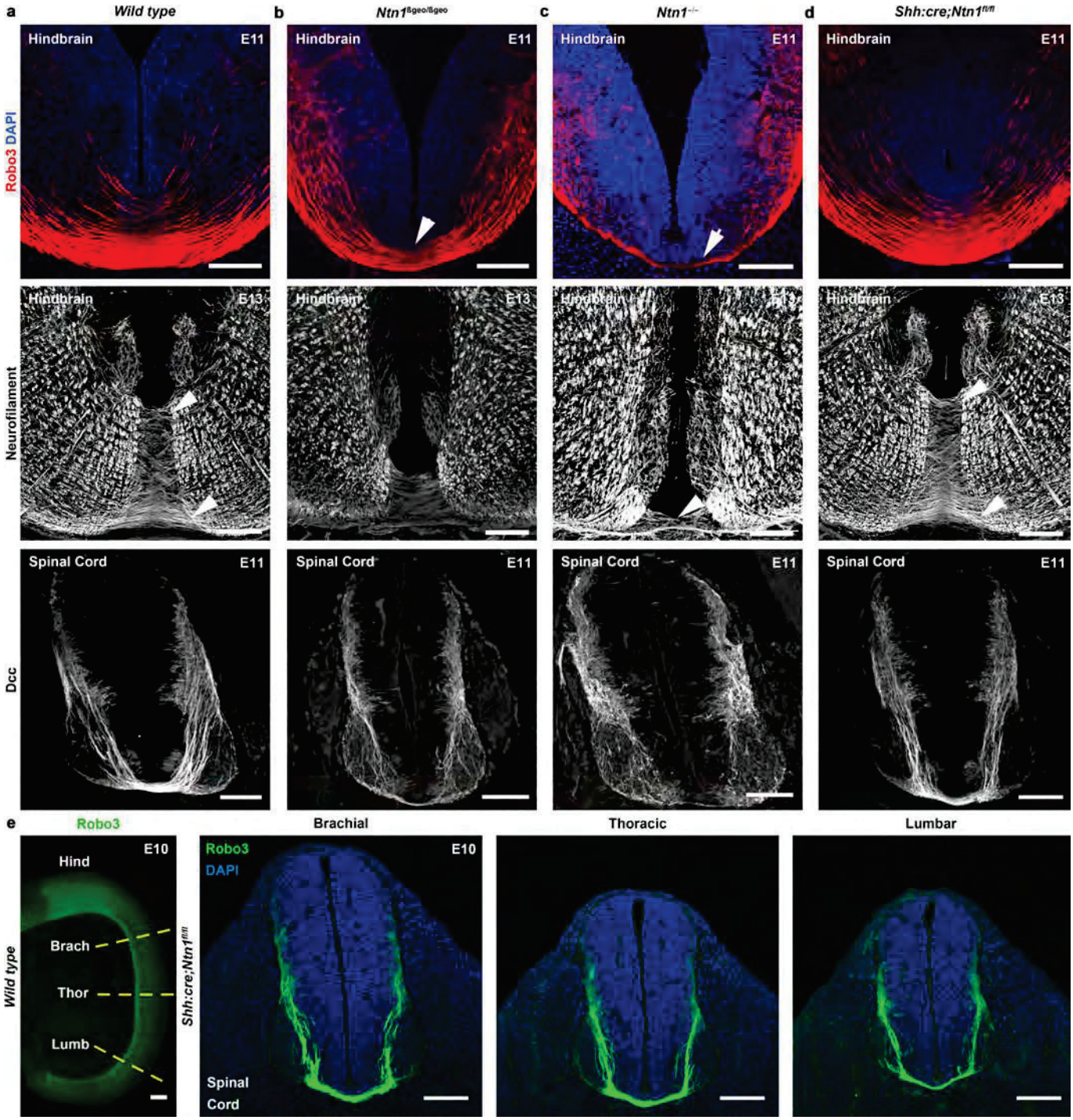
Extended Data Figure 1 | Netrin-1 distribution in hindbrain and spinal cord. Coronal cryostat sections of the hindbrain and spinal cord (brachial level) of E11 and E13 embryos. **a**, At E11, the floor plate (Alcam$^+$ positive cells in green) and commissural axons are immunoreactive for netrin-1 ($n = 6$). **b**, At E13 *Ntn1* mRNA is still expressed in the floor plate (Fp) and ventricular zone of the basal plate ($n = 6$). **c**, In a E11 *Ntn1*$^{\beta geo/+}$ mice, Robo3$^+$ commissural neurons in the dorsal hindbrain (arrowheads) are not immunoreactive for βgal, unlike the basal plate neuroepithelium (arrows; $n = 6$). **d**, Western blot analysis of HEK-293T cells overexpressing human NTN3, NTN1 or mouse Ntn1 proteins ($n = 3$). Left, the monoclonal anti-Ntn1 antibody (MAB1109) specifically recognizes netrin-1 proteins (human and mouse) and not netrin-3. Right, netrin-3 is specifically recognized by the polyclonal anti-NTN3 antibody (ab185200), unlike netrin-1. **e**, At E11, netrin-1 is expressed in the spinal cord by floor plate (arrowhead) and ventricular zone progenitors ($n = 6$). **f**, The floor plate (Alcam$^+$), commissural axons, radial processes of neural progenitors and basal lamina are immunoreactive for netrin-1 ($n = 6$). **g**, At E13 ($n = 7$), netrin-1 is still highly expressed in nestin$^+$ radial processes of neural progenitors and at the pial surface. **h**, **i**, Netrin-1 is absent from the hindbrain of *Ntn1*$^{-/-}$ at E13 (**h**) and the spinal cord at E11 (**i**) ($n = 6$ for each). Floor-plate cells (arrowhead) still express Alcam (green). **j**, Netrin-1 immunostaining without permeabilization at E11. Commissural axons are still labelled (arrowheads) including those that have crossed the midline (arrow). Commissural axons are also stained with anti-Robo3 on the left panel. V, ventricle. **k**, Shows the absence of Dcc immunoreactivity on a hindbrain section from a *Dcc*$^{-/-}$ E11 embryo (DAPI counterstaining, $n = 6$). **l**, The radial processes of neural progenitors are present in *Ntn1*$^{-/-}$ embryos ($n = 6$). Scale bars, 100 μm except in **g**, 50 μm.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.



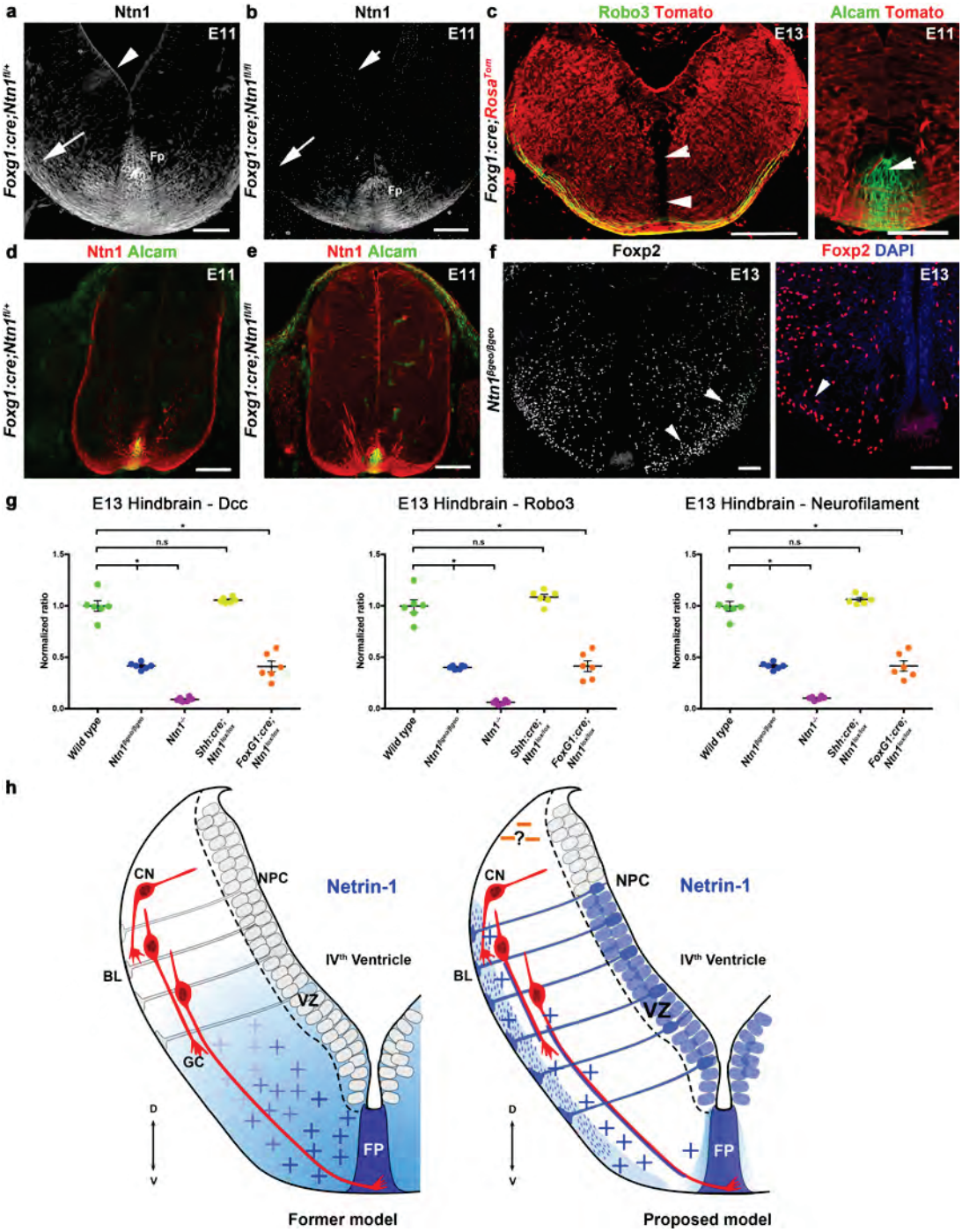
Extended Data Figure 2 | Floor-plate-specific deletion of netrin-1 in *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* mutants. Coronal cryostat sections of the hindbrain and spinal cord of E10 and E11 embryos. **a**–**d**, *In situ* hybridization for *Ntn1* on E11 spinal cord (brachial level). In *Ntn1$^{fl/fl}$* embryos (**a**) *Ntn1* mRNA is highly expressed in floor plate (Fp) and ventricular zone ($n = 6$). Weak *Ntn1* expression is still detected in the floor plate (arrowhead) of *Ntn1$^{\beta geo/\beta geo}$* hypomorphs (**b**) ($n = 5$), whereas no signal is seen in *Ntn1$^{-/-}$* (**c**) embryos ($n = 6$). In *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* embryos (**d**), *Ntn1* mRNA is not expressed in the floor plate (arrowhead) but is still present in the ventricular zone ($n = 6$). **e**, E10 *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* spinal cord sections at brachial, thoracic and lumbar levels. At all levels, netrin-1 is found in the ventricular zone, with the highest levels in the p3 progenitor domain, but is absent from the floor plate (arrowheads, $n = 6$). **f**, **g**, In *Ntn1$^{fl/fl}$* commissural axons, basal lamina (Pia) and floor plate (arrowhead in **f**) are immunoreactive for netrin-1 (**f**). By contrast, the floor plate is not labelled in *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* embryos (arrowhead in **g**) whereas netrin-1 remains expressed along neural progenitor processes and basal lamina (pia; $n = 6/6$). **h**, Western blot with anti-Ntn1 antibody on floor plate extracts from *Ntn1$^{fl/fl}$*, *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* and *Ntn1$^{-/-}$* E11 embryo hindbrain and spinal cord (at least 3 cases for each from 3 independent experiments). Netrin-1 is undetectable in *Ntn1$^{-/-}$* and reduced 90% in *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* mice. **i**, Western blot quantification. Wild-type values were normalized to 1 and mutant values were compared using a non-parametric Mann–Whitney test. Mutant values are represented as the mean ± s.e.m. (*$P < 0.05$; *Ntn1$^{fl/fl}$* to *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* or *Ntn1$^{-/-}$*, Mann–Whitney test ($P = 0.0022$ for both)). Scale bars, 100 μm, except **a**, **b**, **c** and **d** higher magnifications, 50 μm.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.



Extended Data Figure 3 | Floor-plate-derived netrin-1 is not necessary for midline crossing in hindbrain and spinal cord. Coronal cryostat sections of the hindbrain and spinal cord (brachial level) of E10, E11 and E13 embryos. **a**–**d**, E11 and E13 hindbrain sections (upper and middle panels) and E11 spinal cord sections (lower panels). In wild-type mice (**a**), Robo3^{+} and Dcc^{+} commissural axons cross the floor plate ($n = 6$). Midline crossing is reduced in *Ntn1*$^{\beta geo/\beta geo}$ hypomorphs (**b**; arrowheads; $n = 3$) and almost absent in *Ntn1*$^{-/-}$ embryos (**c**; $n = 6$). By contrast, no midline crossing defects are present in *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryos (**d**) ($n = 9$). **e**, Coronal sections at three rostro-caudal levels of the spinal cord of an E10 *Shh:cre;Ntn1*$^{fl/fl}$ embryo labelled with anti-Robo3. Commissural axons cross the floor plate at all levels. The dashed lines on the left panel indicate the level of the sections. Brach, brachial; Hind, hindbrain; Thor, thoracic; Lumb, lumbar. Scale bars, 100 μm, except **e** left panel, 400 μm.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.



Extended Data Figure 4 | Analysis of the *Foxg1:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* mice. Coronal cryostat sections of the hindbrain of E11 and E13 embryos and spinal cord (brachial level) of E11 embryos. **a**, **b**, In *Foxg1:cre;Ntn1$^{fl/+}$* embryos, as in wild type, netrin-1 is expressed in the hindbrain ventricular zone (arrowhead) and commissural axons (arrow). This is not the case in *Foxg1:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* mutants; however, the floor plate (Fp) is still labelled for netrin-1. Note that netrin-1 is present in the vicinity of the Fp ($n = 6$). **c**, *Foxg1:cre* drives Cre expression in E13 (left) and E11 (right) hindbrain cells (tdTomato$^+$ cells in red) but not in the floor plate (arrowheads; $n = 3/3$). A few Alcam$^+$ floor-plate cells are tdTomato$^+$. **d**, **e**, Netrin-1 distribution is similar in the spinal cord of *Foxg1:cre;Ntn1$^{fl/+}$* (**d**) and *Foxg1:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* (**e**) embryos ($n = 5$). **f**, In *Ntn1$^{\beta geo/\beta geo}$*, Foxp2$^+$ olivary neurons fail to migrate ventrally (arrowheads) and only few of them are able to reach to the floor plate (arrowheads; $n = 6$). **g**, Quantification of the size of hindbrain commissures in the different mutants compared to controls. Six embryos of each genotype and nine sections from each were quantified. Data are normalized to wild type and are represented as mean ± s.e.m. (one-way Kruskal–Wallis with Mann–Whitney post-test, $*P < 0.05$; NS, not significant). Comparison between wild type and the different conditions for Dcc, Robo3 and neurofilament, $P < 0.05$, except the comparison between wild type and *Shh:cre;Ntn1$^{fl/fl}$* where: Dcc, $P = 0.0649$; Robo3, $P = 0.1797$; neurofilament, $P = 0.0649$. **h**, Netrin-1 guidance mechanisms of hindbrain commissural axons, past and current models. In the initial model, soluble netrin-1 secreted by floor plate (FP) forms a ventral–dorsal gradient, which attracts ventrally travelling commissural axon (CN) growth cones (GC). In the revised model, pioneer CN axons form in a superficial region containing high levels of netrin-1 produced by neural progenitor cells (NPCs) extending from the ventricular zone (VZ) to the basal lamina (BL) at the surface of the hindbrain. Commissural axons might also capture netrin-1 and establish a netrin-1-rich pathway guiding follower axons. Their ventral extension might be facilitated by chemorepellents produced in the dorsal hindbrain (indicated with a question mark). Scale bars, 100 μm.

© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

ANNEXE 2 :

NETRIN-1 BIPOTENT SIGNALLING CONTROLS BOTH SELF-RENEWAL AND LINEAGE COMMITMENT IN EMBRYONIC STEM CELLS.

D. Ozmadenci[1] , A. Huyghe[1†], G. Furlan[1†], C. Galonska[2†], N. Combémorel[1], J. Charlton[2] , J.Y. Zhang[3] , S. Hermitte[4] , P. Wajda[1] , P. Vieugué[5] , I. Durand[6] , M. Brevet[7], N. Gadot[8] , C. Chazaud[4] , B.J. Merrill[3] , P. Mehlen[5,8ϕ] , A. Meissner[2ϕ] and F. Lavial[1*].

[1] Cellular reprogramming and oncogenesis Laboratory - Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France;

[2] Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA; Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA 02138, USA; Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA;

[3] Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Illinois, Chicago, IL 60607, USA;

[4] GReD, Université Clermont Auvergne, CNRS, INSERM, BP38, 63001 Clermont-Ferrand, France.

[5] Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France;

[6] Cytometry Facility, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France;

[7] Department of pathology, HCL Cancer Institute and Lyon1 University, France;

[8] Plateforme de recherche anatomopathologique, Centre Léon Bérard, France; Department of Translational Research and Innovation, Centre Léon Bérard, France.

[*] Correspondence to: F. Lavial: fabrice.lavial@lyon.unicancer.fr

[†ϕ] Contributed equally to this work

ABSTRACT:

Embryonic stem cells (ESC) are characterized by their ability to self-renew and to differentiate into all lineages. However, even if the switch from self-renewal to lineage commitment is crucial for embryo development, the mechanisms regulating this cell fate decision remain unknown. Here we report that the neuronal guidance cue netrin-1 and its receptors neogenin and UNC5B control this process in mouse ESC. We show that netrin-1 confers to ESC transcriptomic and epigenomic features reflecting an intermediate configuration between the naïve ICM and the late epiblast. In line with this, netrin-1 is specifically expressed in the E4.5 pluripotent compartment in vivo and controls ESC derivation. The established view in stem cell biology advocates that signalling molecules act as pro-self-renewal or pro-lineage commitment cues in a given cell type. In striking contrast, we reveal that netrin-1 is bipotent in mouse ESC, meaning that it exerts both pro-self-renewal and pro-lineage commitment activities depending on the receptor it engages with.
Mechanistically, netrin-1 promotes self-renewal via neogenin by alleviating Mapk signalling and triggering the dynamin-dependent degradation of UNC5B. In contrast, in presence of UNC5B, netrin-1 primes ESC for germ layer segregation by exacerbating their responsiveness to FGF. Altogether, our work identifies a "bipotent signalling" machinery by which a unique signalling molecule controls both self-renewal and the coordinated switch to differentiation in stem cells. Due to the fact that netrin-1 expression is detected in adult stem cells and upregulated in a fraction of human cancers, we speculate that this machinery might operate in other stem cell types to control organism homeostasis and be deregulated in pathological contexts.